



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE FUNCIONES
METABÓLICAS DE HEPATOCITOS PRIMARIOS DE
HÍGADO DE RATA CULTIVADOS EN SUSTRATOS
SUAVES. INFLUENCIA DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR Y HORMONAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
MARISOL AYALA REYES



CDMX

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: **Profesor:** Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Vocal: **Profesor:** Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Secretario: **Profesor:** Dr. Genaro Vázquez Victorio

1er. Suplente: **Profesor:** Dr. Alberto Ortega Vázquez

2do. Suplente: **Profesor:** QA. Javier Axosco Marín

Sitio en donde se desarrolló el tema: Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia. Facultad de Ciencias UNAM

Asesor del tema:

Genaro Vázquez

Dr. Genaro Vázquez Victorio

Supervisor técnico:

Jorge Carretero O.

Dr. Jorge Carretero Ortega

Sustentante:

Marisol Ayala

Marisol Ayala Réyes

A mi tutor el Dr. Genaro Vázquez Victorio por la oportunidad y apoyo para realizar y concluir este trabajo

A mi asesor técnico el Dr. Jorge Carretero Ortega por el apoyo y comprensión que siempre me brindo

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LANSBioDyT) por las herramientas brindadas para la realización de este trabajo

Al CONACyT por la beca que me otorgo para la finalización de este trabajo

A la Dra. Natalia Serna Márquez y a la Dra. Beatriz Díaz Bello por el entrenamiento para el aislamiento de hepatocitos, así como otras técnicas relevantes en este trabajo

A la M. en C. Adriana Rodríguez Hernández, a la M. en C. Lorena Omega Martínez Hernández y a la Licenciada en Física Biomédica Sagrario Avin Hernández por su valiosa colaboración en el presente trabajo

A la memoria de mi madre Rocio Reyes, quien siempre me brindo su amor, comprensión y apoyo incondicional

A mi padre Jaime Ayala y a mi hermana Rocío Ayala por su amor y por siempre motivarme para seguir adelante

A mis amigos Lizbeth López, Eber Martínez y Carlos Ortega por acompañarme, apoyarme y motivarme a lo largo de la carrera

ÍNDICE GENERAL

	Pág
CAPÍTULO 1. RESUMEN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	32
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	58
APÉNDICES	68

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Contenido	Pág
Tabla 1.	Principales funciones del hígado	8-9
Tabla 2.	Componentes estructurales de la matriz extracelular	17-18
Tabla 3.	Reactivos e instrumentación utilizados durante la realización de este estudio	25

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Contenido	Pág
Figura 1.	Anatomía del hígado	5
Figura 2.	Vascularización hepática	6
Figura 3.	Zonas metabólicas hepáticas	7
Figura 4.	Representación esquemática de cultivos de hepatocitos primarios en modelos 2D y 3D	13
Figura 5.	Composición de hidrogeles de poliacrilamida	15
Figura 6.	Matriz extracelular hepática	17
Figura 7.	Metodología para la obtención y caracterización de proteínas de matriz extracelular a partir de hígados descclularizados	34
Figura 8.	Efecto de la rigidez del sustrato en el área celular de hepatocitos cultivados. Sustratos suaves favorecen la preservación del fenotipo hepático a periodos largos de tiempo.....	36
Figura 9.	La colágena tipo I en hidrogeles de poliacrilamida promueven la adhesión y viabilidad de los hepatocitos primarios	38
Figura 10.	Los extractos de matriz extracelular descclularizada de 48 h en hidrogeles de poliacrilamida promueven la adhesión y supervivencia mejor que los extractos de matriz extracelular descclularizada de 2 h.....	39
Figura 11.	El factor de crecimiento epidérmico es capaz de rescatar la viabilidad de hepatocitos en sustratos suaves con extractos de matriz extracelular descclularizada de 2 h, pero no en hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves con proteínas asociadas a la membrana basal.....	41
Figura 12.	El factor de crecimiento epidérmico no es capaz de promover la proliferación de hepatocitos, pero se ve implicado en la formación de agregados celulares	43
Figura 13.	Los hepatocitos primarios cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa conjugados con colágena preservan sus depósitos de glucógeno después de 120 h de cultivo	45

ABREVIATURAS

MEC	matriz extracelular
MB	membrana basal
NPC	non-parenchymal cells, por su nombre en inglés
LSEC	liver sinusoidal endothelial cell, por su nombre en inglés
SC	stellar cell por su nombre en inglés
KC	kupffer cell, por su nombre en inglés
HGF	hepatocyte growth factor, por su nombre en inglés
EGF	epidermal growth factor, por su nombre en inglés
CYP450	citocromo P450
LPS	lipopolisácarido
OSM	oncostatina M
TNF- α	tumor necrosis factor, por su nombre en inglés
DEX	dexametasona
HEPES	(ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico)
NaCl	cloruro de sodio
KCl	cloruro de potasio
CaCl ₂	cloruro de calcio
MgSO ₄	sulfato de magnesio
APTES	((3-Aminopropil) trietoxisilano)
NH ₄ OH	hidróxido de amonio
MgCl ₂	cloruro de magnesio
APS	persulfato de amonio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
PAA	poliacrilamida
Na ₂ CO ₃	bicarbonato de sodio
Na ₂ S ₂ O ₃	tiosulfato de sodio
PFA	paraformaldehído

CAPÍTULO 1

RESUMEN

CAPÍTULO 1. RESUMEN

RESUMEN

El hígado es un órgano crítico para la homeostasis del organismo ya que lleva a cabo un complejo conjunto de funciones entre las que destacan: el metabolismo de carbohidratos, la biotransformación y desintoxicación de xenobióticos, el mantenimiento del ciclo activo de la urea y la síntesis de albúmina. Estas funciones son atribuidas principalmente a las células parenquimatosas hepáticas, los hepatocitos, las cuales comprenden aproximadamente el 60% de las células totales. En condiciones fisiológicas, los hepatocitos se encuentran embebidos en una matriz extracelular suave que contiene una concentración importante de colágenos fibrilares en combinación con proteínas asociadas a la membrana basal (MB). La población celular restante la conforman las denominadas células no parenquimatosas (NPC) que son de vital importancia para mantener la homeostasis de los hepatocitos. Actualmente, el mejor modelo *in vitro* para el estudio de las funciones hepáticas es el cultivo de hepatocitos primarios, que ofrece la posibilidad de desarrollar modelos de toxicidad ante fármacos disminuyendo o incluso prescindiendo de estudios *in vivo* en animales de laboratorio, y en el caso de aplicaciones médicas, la posibilidad de realizar trasplantes de células hepáticas. Desafortunadamente, los hepatocitos cultivados no preservan su fenotipo, es decir, no conservan la mayoría de sus funciones como cuando forman parte de un hígado intacto. Esto se debe a la estrecha regulación de la función hepática mediada por las células no parenquimatosas y el microambiente químico-mecánico dentro del lobulillo hepático. Por consiguiente, este trabajo de tesis estuvo enfocado en generar un microambiente biomimético adecuado que ayudara a preservar el fenotipo de los hepatocitos primarios considerando diversos factores como: (1) el control de las propiedades mecánicas del sustrato haciendo uso de hidrogeles de poliacrilamida, (2) la influencia de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno tipo I de cola de rata y Matrigel®, ambas utilizadas como referencias de colágenas fibrilares y de MB respectivamente, así como mezclas a diferentes porcentajes de dichos componentes, y (3) el efecto de la suplementación del medio de cultivo con hormonas y factores de crecimiento. Nuestros resultados mostraron que la contribución de la rigidez y la constitución de las proteínas de la matriz extracelular son de suma importancia en la adhesión, sobrevivencia y organización de los hepatocitos, así como en ciertos procesos fisiológicos como la síntesis y almacenamiento de glucógeno. De manera importante se destaca el papel del colágeno tipo I en la sobrevivencia de los hepatocitos en condiciones suaves de cultivo y en la agregación en los hepatocitos independientemente del efecto del EGF. Estos hallazgos podrían establecer las bases para estudios de Fisiología y Biología Celular, donde la preservación de las funciones y fenotipo de células primarias por períodos prolongados de tiempo son indispensables.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Anatomía y estructura del hígado

2.1.1 Aspectos generales de la organización anatómica del hígado

El hígado es el órgano interno más grande en el cuerpo humano y representa aproximadamente del 2% al 3% del peso corporal promedio. El hígado se encuentra ubicado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal protegido por la caja torácica. Posee 2 lóbulos principales, los cuales son la unidad estructural del hígado (**Figura 1A**). Los lóbulos del hígado se componen de numerosas unidades funcionales, llamadas lobulillos hepáticos. Cada lobulillo consiste en células epiteliales altamente especializadas responsables de realizar muchas de las funciones atribuidas al hígado y que son los hepatocitos [1,2]. Estos forman placas, de una o dos células de grosor, conectadas unas con otras alrededor de una vena central formando cordones de 15 células aproximadamente (**Figura 1B**). Cada una de estas placas está separada una de otra por grandes espacios epiteliales llamados sinusoides. Estos se encuentran revestidos por células endoteliales con prolongaciones y fenestras. Debido a que la fenestra de los sinusoides hepáticos carece de un diafragma y de MB, suelen ser más permeables a otros capilares e incluso permiten el paso de proteínas plasmáticas con moléculas apolares unidas a las proteínas, como lípidos, ácidos grasos y colesterol. La fenestra, la falta de MB y la estructura en placas de hígado permiten un contacto íntimo entre los hepatocitos y el contenido de la sangre proveniente del intestino [1,3].

Además de los hepatocitos, los lobulillos están compuestos por varios tipos de células incluyendo células epiteliales biliares (colangiocitos), células estrelladas, células de Kupffer (monocitos) y células endoteliales sinusoidales del hígado (**Figura 1C**). Cada uno de estos tipos de células poseen funciones únicas que regulan cooperativamente la función hepática en múltiples niveles (para más detalle véase el apartado 2.4.2).

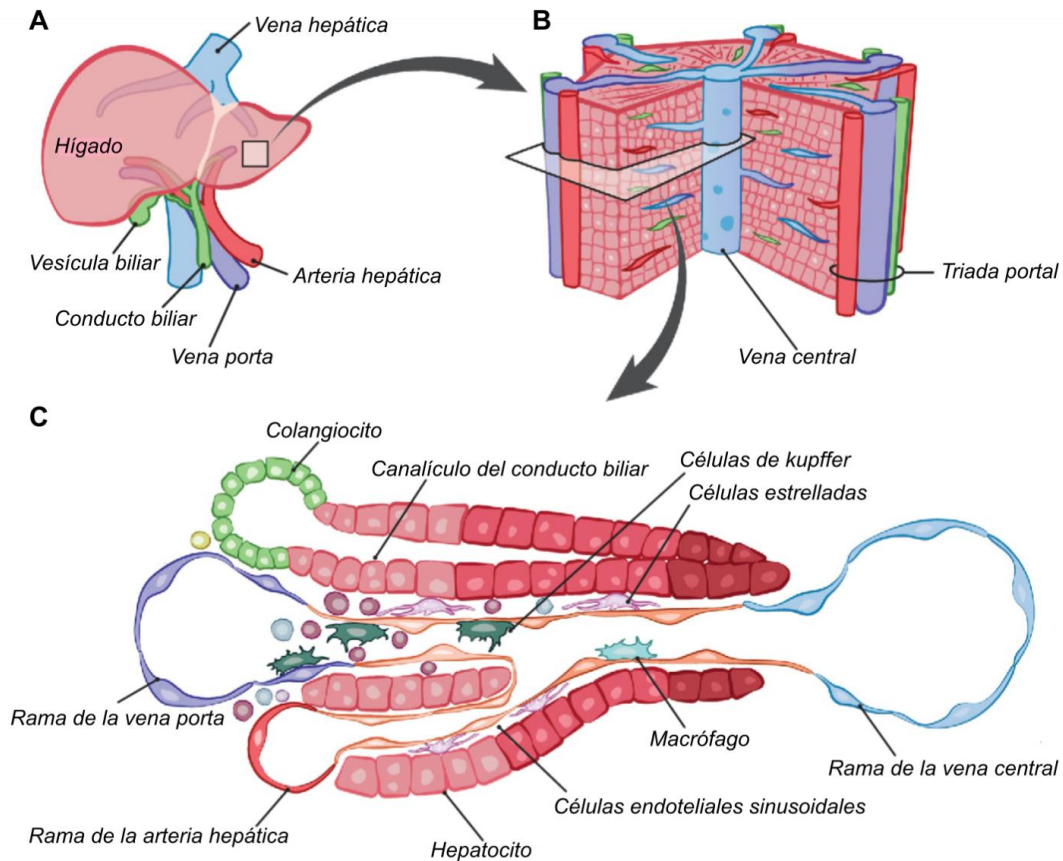


Figura 1. Anatomía del hígado. (A) El hígado se encuentra dividido en 2 lóbulos principales: un lóbulo derecho grande y un lóbulo izquierdo más pequeño. Recibe el aporte de sangre de dos fuentes: la arteria hepática y la vena porta. (B) Cada uno de los lóbulos están constituidos por unidades funcionales más pequeñas llamadas lobulillos, formados por cordones de hepatocitos de una o dos células de espesor, conformados en placas hexagonales. En cada vértice del lobulillo hepático se encuentra la triada portal, conformada por la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. Dicha estructura es de suma importancia para la irrigación sanguínea del hígado desembocando en la vena central (C). A nivel celular, los lobulillos hepáticos se conforman principalmente por células parenquimatosas (hepatocitos), no obstante, también se encuentran presentes células no parenquimatosas que se encargan de brindar soporte a los hepatocitos, entre ellas se encuentran los colangiocitos, las células estrelladas, las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales. Figura modificada de [4]

2.1.2 Irrigación y angioarquitectura del hígado

El hígado es un órgano muy vascularizado, que en reposo recibe entre el 25 y 30 por ciento del gasto cardíaco total como consecuencia de su doble irrigación sanguínea suministrada por la arteria hepática y la vena porta. La arteria hepática aporta el 25 por ciento del suministro total de sangre al hígado proveyendo sangre rica en oxígeno [1]. Mientras que la vena porta, suministra el 75 por ciento de sangre restante (Figura 2A). A través de esta última, el hígado recibe sangre desoxigenada que contiene nutrientes, xenobióticos y sustancias tóxicas absorbidas en el intestino. Las ramas de ambos vasos desembocan dentro de los sinusoides hepáticos del lobulillo hepático donde los hepatocitos captan el oxígeno, nutrientes y toxinas. Los compuestos que producen los hepatocitos y los nutrientes necesarios para las células

son secretados nuevamente a la sangre a través de la vena central, para finalmente salir a la vena cava inferior. Las ramas de la arteria hepática y de la vena porta junto con los conductos biliares son parte fundamental de la organización del lobulillo hepático. Estas estructuras, en su conjunto, se conocen como triada portal (**Figura 1B y 2B**).

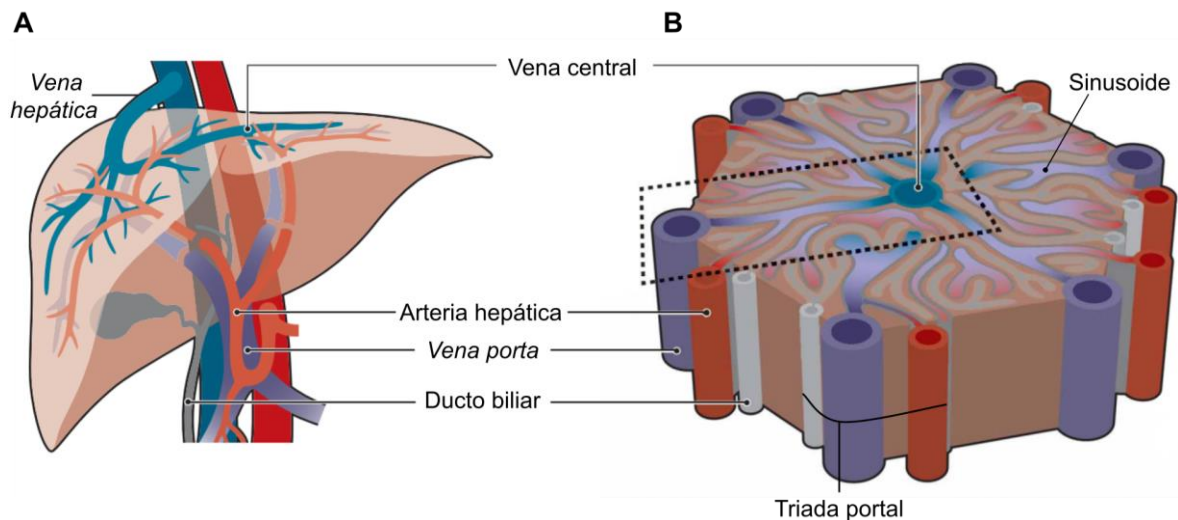


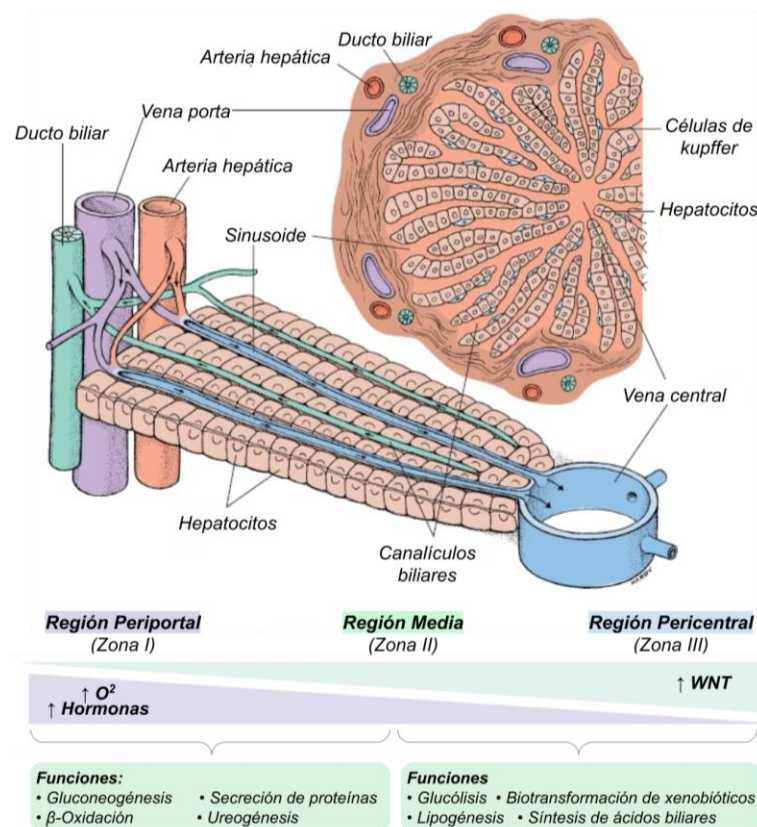
Figura 2. Vascularización hepática. (A) Macroanatomía del hígado humano recibiendo doble suministro sanguíneo; sangre rica en nutrientes de la vena porta y sangre oxigenada de la arteria hepática. La sangre sale por la vena hepática. La vesícula biliar recolecta la bilis producida por los hepatocitos y la libera al tracto gastrointestinal a través del conducto biliar. (B) Descripción general de la vasculatura de un lobulillo hepático. Cada lobulillo está flanqueado por vías portales, compuestas por conductos biliares y el riego sanguíneo dual entrante de las ramas de la arteria hepática y la vena porta, llamada triada portal. La sangre fluye a través de los sinusoides, las ramas terminales de la vasculatura del hígado y sale por las venas centrales. Figura modificada de [5]

2.1.3 Zonas metabólicas hepáticas

Los hepatocitos son células especializadas, que individualmente parecen ser homogéneas a lo largo del eje porto-central, no obstante, se ha demostrado que muestran una enorme heterogeneidad con respecto a las funciones subcelulares, bioquímicas y fisiológicas de acuerdo con su ubicación en dicho eje. Esto se debe a que existen diferencias importantes dentro del microambiente que ocasionan cambios en las propiedades bioquímicas de las células [6–8]. Lo anterior nos indica que las funciones atribuidas a los hepatocitos se encuentran preferentemente en una u otra zona del hígado, a esto se le conoce por su término en inglés “liver zonation”. Estas zonas metabólicas son bastante dinámicas, ya que la mayoría de los patrones de expresión génica y, en consecuencia, las distribuciones enzimáticas cambian en respuesta a la nutrición, los fármacos, las hormonas y otros factores transmitidos por la sangre. Se sabe que los gradientes de morfógenos como Wnt, hedgehog, hormonas o factores de crecimiento como HGF y otros factores como el oxígeno actúan en conjunto, dirigiendo la expresión génica a los hepatocitos diferenciados ubicados en zonas específicas del hígado [8].

Las zonas en el hígado se dividen principalmente en región periportal y región pericentral, también conocidas como zona I y zona III respectivamente. Los hepatocitos localizados en la región periportal se encuentran expuestos a condiciones ricas en nutrientes y oxígeno debido a que se encuentran cerca la triada portal. En consecuencia, los procesos que demandan estas condiciones, como la β -oxidación mitocondrial, la gluconeogénesis y la secreción de proteínas ocurren predominantemente en esta región. Los hepatocitos localizados en la región pericentral participan preferentemente en la biotransformación de xenobióticos, la glucólisis, la lipogénesis y la síntesis de ácidos biliares. Sin embargo, también se reconoce otra región la cual se denomina región media o zona II, que se encuentra entre la región periportal y la región pericentral; los hepatocitos ubicados en esta zona se especializan en la regulación del metabolismo del hierro, entre otras funciones [8,9] (Figura 3).

Figura 3. Zonas metabólicas hepáticas. Las funciones hepáticas no se distribuyen uniformemente a lo largo eje porto-central del lobulillo hepático, sino que, dependiendo de las condiciones microambientales en donde se ubiquen los hepatocitos, realizarán preferentemente ciertas funciones.



Se reconocen dos regiones principales: la región periportal (zona I) y la región pericentral (zona III). La región periportal se encuentra próxima a la triada portal por lo que los hepatocitos ahí ubicados se encuentran en condiciones abundantes de oxígeno y nutrientes, permitiendo que se lleven a cabo preferentemente funciones oxidativas. En la región pericentral, ubicada cerca de la vena central, los hepatocitos desempeñan funciones que no son dependientes de oxígeno tales como la transformación de xenobióticos y desintoxicación de fármacos y toxinas. Figura modificada de [10].

Como se puede apreciar, los patrones de establecimiento de zonas metabólicas en el hígado de los hepatocitos parecen optimizar la función hepática general, ya que dependiendo de su ubicación realizarán predominantemente ciertas funciones que ayudarán a la homeostasis del organismo [11].

2.2 Funciones del hígado

El hígado es uno de los órganos más importantes y complejos del cuerpo, desempeña un papel central manteniendo la homeostasis metabólica a través del procesamiento de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y vitaminas de la dieta. De manera que es capaz de regular la concentración de glucosa en sangre de acuerdo con las necesidades del cuerpo. Sintetiza la bilis que optimiza la absorción de lípidos y sintetiza factores endocrinos y proteínas plasmáticas, entre estas últimas la albúmina es la más abundante y funciona como un modulador significativo de la presión oncótica plasmática y como un transportador de ligandos endógenos y exógenos [12]. El hígado también es el principal órgano desintoxicante, es decir, elimina desechos celulares y xenobióticos mediante la conversión metabólica y excreción biliar [13,14].

En la Tabla 1 se hace referencia a las funciones más importantes del hígado:

Tabla 1. Principales funciones del hígado

Función	Acción
Biotransformación / Metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> • Biotransformación de xenobióticos: Conversión de fármacos a metabolitos solubles [3]. • Metabolismo de carbohidratos: Conversión de la glucosa sanguínea en glucógeno y ácidos grasos. Producción de glucosa a partir de glucógeno hepático y otras moléculas por gluconeogénesis. Secreción de glucosa en la sangre [3]. • Metabolismo de Lípidos: Síntesis de triglicéridos y colesterol, excreción de colesterol en la bilis. Producción de cuerpos cetónicos a partir de los ácidos grasos [3].
Desintoxicación de la sangre	Fagocitosis por las células de Kupffer. Alteración química de moléculas biológicamente activas (hormonas y fármacos). Producción de urea, ácido úrico y otras moléculas. Excreción de moléculas en la bilis [3].

Almacenamiento	Reserva de proteínas y de glucógeno para satisfacer las necesidades globales de glucosa en el organismo. Es el sitio más importante para el almacenamiento de retinol (vitamina A) [3,15].
Síntesis de proteínas	Producción de albúmina, de proteínas de transporte plasmático y de factores de la coagulación. Asimismo, en el hígado se sintetizan la mayoría de las proteínas del sistema del complemento [3,16,17].
Secreción de bilis	Síntesis de sales biliares. Conjugación y excreción de pigmentos biliares [3].

2.2.1 Metabolismo hepático

Como puede apreciarse en la Tabla 1, el hígado es un órgano clave para muchos procesos metabólicos; actúa como eje central que conecta varios tejidos, incluidos el músculo esquelético y el tejido adiposo; por ejemplo, después de la digestión de los alimentos en el tracto gastrointestinal, la glucosa y los aminoácidos se incorporan al torrente sanguíneo y son transportados al hígado a través del sistema de circulación de la vena porta. La glucosa de la sangre portal es utilizada según la demanda del momento y el exceso es convertido por el hígado en glucógeno y ácidos grasos. En los hepatocitos, los ácidos grasos se esterifican con glicerol-3-fosfato para generar triacilglicerol (TAG), el cual es almacenado en gotas lipídicas. Por otra parte, los aminoácidos son catabolizados para proporcionar energía o bien, son utilizados en la síntesis de proteínas, glucosa u otras moléculas biológicamente activas. En condiciones como el ayuno o durante el ejercicio estos sustratos se liberan del hígado a la circulación y son metabolizados por los músculos, el tejido adiposo y otros tejidos extrahepáticos. Ejemplos de cooperación del hígado con otros tejidos u órganos para mantener la homeostasis del organismo son los que existen con el tejido adiposo y el músculo, los cuales liberan ácidos grasos no esterificados, glicerol, así como lactato y alanina. Estas moléculas son utilizadas por el hígado como precursores para la gluconeogénesis, mientras que los ácidos grasos no esterificados por medio de la β -oxidación generan cuerpos cetónicos (cetogénesis). La glucosa y los cuerpos cetónicos generados por el hígado funcionan como combustibles metabólicos esenciales para los tejidos extrahepáticos durante situaciones de alta demanda energética como el ejercicio o el ayuno prolongado [18].

2.2.2 Hepatocitos, desintoxicación y biotransformación de xenobióticos

Otra de las funciones importantes del hígado es la de desintoxicación o eliminación de sustancias nocivas para el organismo. El hígado se encarga de desintoxicar la sangre de sustancias que se originan principalmente en el intestino, así como en otros órganos o tejidos del cuerpo. Dentro del hígado, células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y células dendríticas reconocen agentes patógenos gracias a que presentan receptores que identifican distintos patrones moleculares asociados al agente patógeno, facilitando así su eliminación. Así mismo, el hígado es capaz de eliminar hormonas, fármacos u otras moléculas bioactivas transportadas en la sangre ya sea por su excreción en la bilis, por fagocitosis a través de las células de Kupffer o por la alteración química de estas moléculas en los hepatocitos, este último proceso se conoce como biotransformación de xenobióticos, el cual es sin lugar a duda una de las funciones más importantes del hígado [3,19]. Los xenobióticos se definen como sustancias químicas extrañas a un sistema biológico, es decir, que no se producen en el cuerpo. Muchos de los fármacos utilizados en la terapéutica son xenobióticos y aunque algunos de estos se eliminan intactos del cuerpo humano, muchos otros experimentan cambios estructurales que los hacen más solubles para facilitar su excreción en la orina o la bilis [20].

En ocasiones el riñón es incapaz de eliminar eficientemente sustancias lipofílicas por lo que dichos agentes liposolubles deben metabolizarse o biotransformarse primero en el hígado por medio de dos tipos de reacciones enzimáticas, conocidas como de fase I y fase II. En las reacciones de fase I se convierten moléculas lipofílicas en moléculas más polares al introducir o exponer un grupo funcional polar (-OH o -NH₂). Las enzimas que catalizan este tipo de reacciones de óxido-reducción pertenecen a la superfamilia del sistema citocromo P450 (CYP450), entre las que destacan CYP3A4, CYP1A2 y CYP2E1 [21]. Aun cuando las reacciones de óxido-reducción son las más comunes para biotransformar los fármacos, hay otras de igual importancia, entre ellas se pueden mencionar reacciones de hidrólisis, oxidación de aminas y deshidrogenación de alcoholes, todas ellas sin intervención del sistema P-450 [22]. Por otro lado, las reacciones de fase II se conocen como de conjugación y pueden ocurrir directamente en los compuestos originales que contienen motivos estructurales apropiados o en grupos funcionales agregados o expuestos por reacciones de fase I. Las principales enzimas involucradas en reacciones de fase II se conocen colectivamente como "transferasas", ya que catalizan la transferencia de una fracción de una molécula donante al receptor del fármaco. Las reacciones de fase II más comunes e importantes incluyen: glucuronidación, sulfatación, acetilación y metilación. Todas estas reacciones de conjugación confieren mayor solubilidad a los xenobióticos permitiendo así su fácil excreción en la bilis u orina [22].

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema citocromo P450 constituye el mayor complejo enzimático en el metabolismo de fármacos en nuestro organismo, al jugar un papel fundamental en la fase oxidativa del metabolismo. En las reacciones

de fase I, las enzimas metabolizadoras que destacan son CYP1A2, CYP3A4 y CYP2E1. El CYP1A2 representa aproximadamente el 6% del contenido total de enzimas CYP450 en el hígado humano [23], tiene sustratos como aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos; entre los fármacos metabolizados preferentemente por esta enzima se encuentran el acetaminofén, la cafeína, la clozapina, la fenacetina, la tacrina y la teofilina [24]. El CYP3A4 es aparentemente la enzima CYP450 más importante para la biotransformación de fármacos en humanos, ya que representa un porcentaje considerable del contenido de estas enzimas en el hígado, aproximadamente el 11% [23], y se sabe participa en la biotransformación de la mayoría de fármacos con vías metabólicas conocidas, como la ciclosporina, el tacrolimus y la carbamazepina [25]. Por último, el CYP2E1 es el CYP más abundante en el hígado, representando aproximadamente el 21% del contenido total de estas enzimas, es responsable de biotransformar los xenobióticos a diversos intermediarios, los cuales son posteriormente transformados en sustancias no tóxicas por medio de reacciones de conjugación en la biotransformación de fase II, como se explicó en el párrafo anterior. No obstante, algunos intermediarios de este tipo de transformaciones son metabolitos reactivos y pueden unirse de manera covalente a macromoléculas formando aductos que alteran la estructura y función hepatocelular conduciendo consecuentemente a lesiones hepáticas [23]. Un ejemplo de hepatotoxicidad por metabolitos reactivos es el caso del *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), producto de la transformación del acetaminofén. Una ingesta alta de acetaminofén lleva a una elevada producción de NAPQI que resulta en estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y por último necrosis hepática.

2.3 Cultivo de hepatocitos primarios como modelo de estudio de las funciones del hígado

En la actualidad, el mejor modelo *in vitro* para estudiar los mecanismos de las funciones hepáticas es el cultivo de hepatocitos primarios. En un órgano intacto, los hepatocitos, se polarizan con dominios luminales distintos que están separados por uniones estrechas de los dominios laterales que participan en la adhesión célula-célula y de los dominios basales que interactúan con la matriz extracelular subyacente [26]. Desafortunadamente, cuando los hepatocitos son cultivados pierden su polaridad, por ejemplo, la distribución diferencial de fosfolípidos, complejos proteicos y componentes citoesqueléticos entre los diversos dominios de la membrana plasmática se ve alterada, y por lo tanto no se preserva la mayoría de las funciones hepáticas como cuando forman parte en un hígado intacto. Esto es debido a la estrecha regulación de la función hepática mediada por las células no parenquimatosas y el microambiente químico-mecánico dentro del lobulillo hepático. Se ha demostrado que el cultivo de hepatocitos en sándwich de colágena reproduce en un grado significativo la polaridad de los hepatocitos *in vivo*, propiedad esencial, como ya se ha mencionado, tanto para la estructura como para la función del hígado. Entre otras ventajas, este modelo permite estudiar las propiedades biológicas celulares clave de hepatocitos como: la morfología poligonal, la secreción de albúmina

y la actividad transcripcional general del hígado [27–29]. Así como este modelo, se han desarrollado otras estrategias de cultivo primario de hepatocitos debido al creciente interés en generar un microambiente biomimético que ayude a preservar el fenotipo y funciones de los hepatocitos para futuras aplicaciones farmacológicas y médicas. Ejemplos interesantes son los organoides y los órganos en Chip (**Figura 4**). Los organoides derivan de células madre multipotentes y autorrenovables, de manera que se generan mediante la diferenciación de las células madre en miniórganos funcionales que consecuentemente forman una estructura tipo esférica tridimensional (por interacciones célula-célula). Asimismo, se ha informado que los hepatocitos primarios maduros son capaces de formar organoides por sí mismos, los cuales conservan características morfológicas, funcionales y de expresión génica durante varios meses de cultivo en condiciones óptimas [30]. De manera que este modelo de cultivo es capaz de desempeñar muchas de las funciones del hígado, sin embargo, su capacidad funcional no es comparable con la de un hígado maduro adulto. El modelo o dispositivo de hígado en Chip, desarrollado ante la problemática del uso de modelos animales tanto por la parte ética como por la parte funcional, está basado en un control preciso del entorno de cultivo, y su diseño busca optimizar la función de los hepatocitos para evaluar las respuestas del hígado humano ante fármacos de interés terapéutico o para modelar patologías específicas del hígado. Para ambos modelos, encontrar el microambiente idóneo para los hepatocitos es de suma importancia, por lo que incluso se ha propuesto la combinación de estos modelos, los organoides y los de hígado en Chip, ya que se cree que podría proporcionar ventajas para imitar de manera más fiel a la función hepática [31,32].

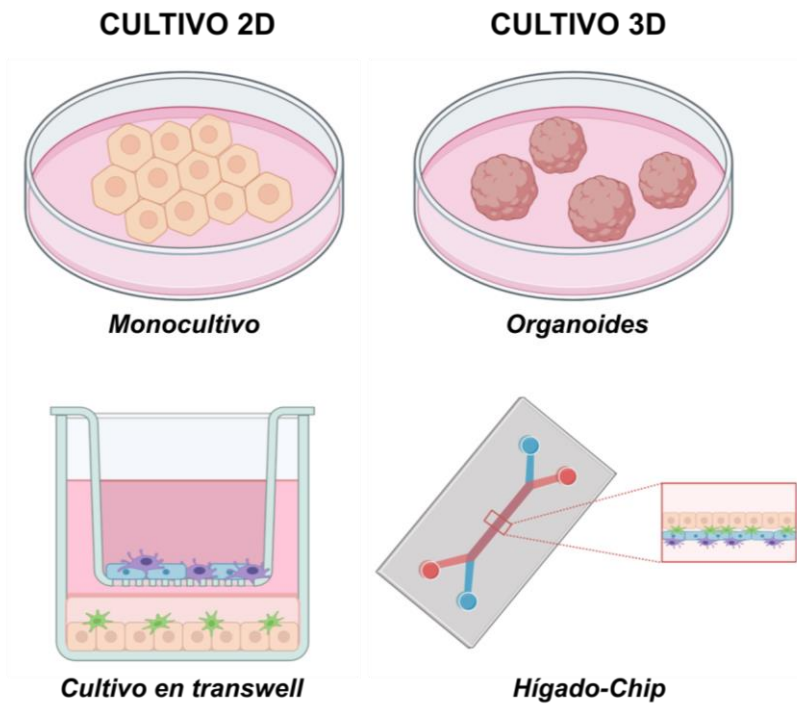


Figura 4. Representación esquemática de cultivos de hepatocitos primarios en modelos 2D y 3D. Actualmente, la creación de modelos óptimos para el cultivo celular *in vitro* es de gran importancia, ya que el comportamiento de las células cultivadas depende de las características de cada modelo. Los modelos de cultivo 2D (células en monocapa) no son capaces de emular las interacciones célula-célula y célula-entorno extracelular, las cuales son responsables de muchas de las funciones celulares, que incluyen la diferenciación, la proliferación, la viabilidad, así como la capacidad de respuesta a los estímulos. A diferencia del monocultivo, el modelo de cultivo en transwell permite la interacción entre las diferentes células que integran el tejido, de tal forma que puede imitar de manera más fiel la compleja arquitectura del órgano, pero sin embargo sigue siendo un modelo con limitaciones. Como respuesta a lo anterior, se han planteado modelos alternativos de cultivo en 3D, organoides e hígado en chip, los cuales asemejan las condiciones del entorno natural de las células que conforman un órgano y las interacciones que se encuentran regulando las distintas funciones celulares [33].

2.3.1 Aislamiento de hepatocitos primarios

Se ha demostrado que el cultivo primario de hepatocitos resulta una herramienta fundamental para el estudio de la toxicidad, interacción y metabolismo de nuevos fármacos en el hígado [34]. Por lo anterior, la optimización del método de aislamiento de hepatocitos es esencial para los distintos modelos hepáticos. Aunque inicialmente los hepatocitos se habían aislado mediante métodos mecánicos, se ha demostrado que los métodos enzimáticos son superiores, ya que los hepatocitos conservan su integridad estructural y su función después del aislamiento. El método estándar para el aislamiento de hepatocitos es el de la perfusión de dos pasos. En este método, el hígado se perfunde inicialmente con una solución amortiguadora (HEPES) libre de Ca^{2+} , para posteriormente ser perfundido con una solución de colagenasa en presencia de Ca^{2+} . La ausencia de Ca^{2+} en el primer paso del aislamiento ayuda a romper los desmosomas, mientras que su presencia en la segunda perfusión es necesaria para la actividad óptima de la colagenasa. Cabe resaltar que para este

método se utilizan colagenasas producidas por *Clostridium histolyticum*, las cuales tienen la capacidad de digerir colágenas fibrilares nativas de triple hélice de tipos I, II y III, permitiendo así el aislamiento de las células hepáticas en donde su matriz extracelular es rica en colágena tipos I y III [35,36].

2.4. Factores determinantes para la conservación de la función hepática en cultivo de hepatocitos primarios

Se piensa que una de las causas más importante de la pérdida del fenotipo de hepatocitos en modelos *in vitro* es la falta de interacciones entre los hepatocitos, así como de otros factores que ayudan a mantener dicho fenotipo. En este proyecto de tesis se destacan tres de estos factores: (1) la rigidez del sustrato en el cual los hepatocitos son cultivados, (2) la incorporación de proteínas de matriz extracelular a esos sustratos, y (3) el impacto de los componentes o suplementos que conforman el medio de cultivo. A continuación se describen con mayor detalle cada uno de ellos.

2.4.1 Rigidez del sustrato y mecanotransducción

La rigidez de la MEC es particularmente relevante en el hígado, ya que la fisiología y la patología de este órgano están estrechamente correlacionadas con módulos específicos de elasticidad. La propiedad de rigidez la podemos definir como la resistencia de un material al ser deformado por una fuerza en una área definida; de ahí deriva que se representa en pascales (Pa). La rigidez de los tejidos en vertebrados varía de unos cuantos cientos de pascales a miles o cientos de miles. Diversos estudios han demostrado que la rigidez de la matriz extracelular se ve alterada en el hígado sano en comparación con uno fibrótico. Se sabe que la rigidez de la MEC en el hígado sano se encuentra alrededor de los 150 Pa y aumenta a 1-6 kPa en áreas cercanas a la deposición de colágeno fibrilar en hígados fibróticos. Los niveles de rigidez fibróticos tienen efectos sobre la tensión citoesquelética e inhiben ciertas funciones en los hepatocitos [37–39].

Durante el cultivo *in vitro*, las células son capaces de detectar señales mecánicas de los sustratos, al anclarse a la matriz extracelular. En los últimos años, diversos estudios han revelado el impacto de la mecanotransducción en muchos aspectos del comportamiento de las células, tanto en estados nativos como cultivadas, ya que varias funciones celulares dependen estrictamente de las fuerzas mecánicas ejercidas por el entorno extracelular, incluidas la diferenciación celular, el mantenimiento del fenotipo diferenciado, la motilidad, la adhesión, el crecimiento y la supervivencia. Es por esto que la mecánica del sustrato, elasticidad y rigidez, debe controlarse en los cultivos celulares [40].

Los geles basados en componentes de MEC naturales, como el colágeno tipo I, Matrigel y fibrina, cuya rigidez se puede modular modificando la densidad de las proteínas de la MEC o mediante la reticulación basada en interacciones

electrostáticas, son una opción interesante para regular la diferenciación y proliferación de los hepatocitos. No obstante, podría haber una baja reproducibilidad debido a la variabilidad intrínseca del grado de pureza debido a los procesos de purificación. Por consiguiente, los hidrogeles basados en polímeros elásticos y viscoelásticos, como la poliacrilamida (**Figura 5**) son una excelente alternativa debido a que garantizan una excelente reproducibilidad del control mecánico de rigidez y ofrecen la posibilidad de conjugar cualquier componente de MEC en ellos, permitiendo una mejor imitación de la MEC hepática [41,42].

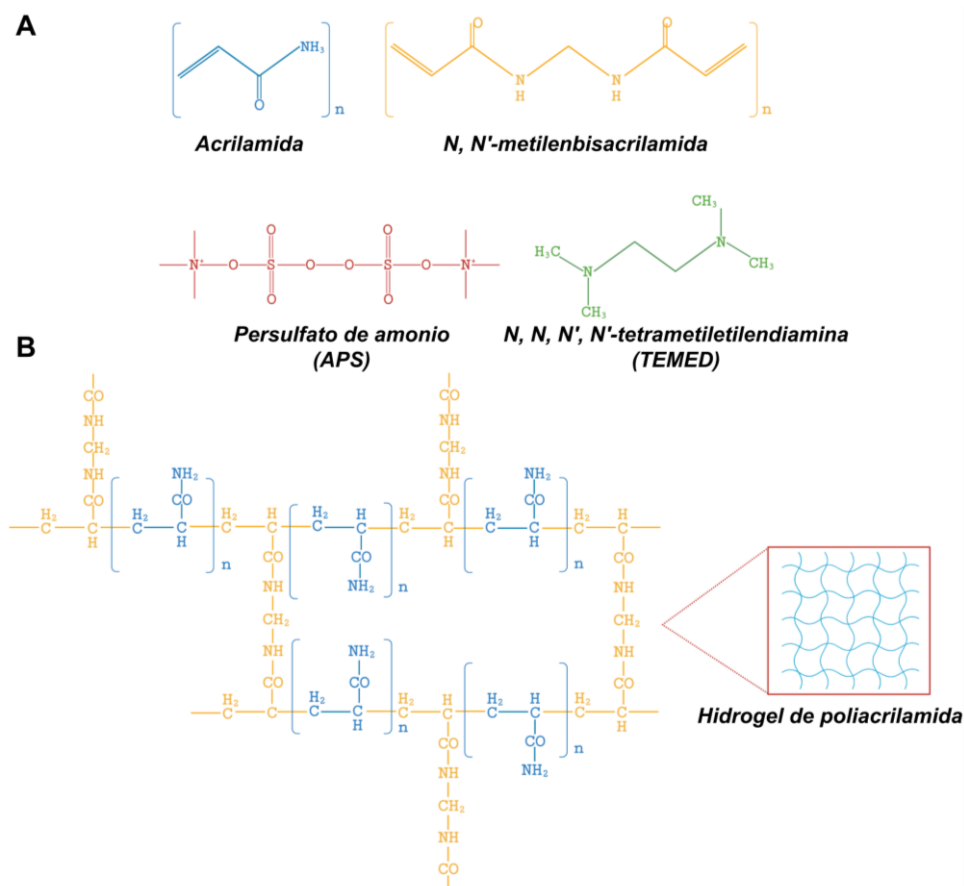


Figura 5. Composición de hidrogeles de poliacrilamida. (A) Los hidrogeles de poliacrilamida están compuestos por una mezcla de acrilamida y *N,N'*-metilenbisacrilamida. La polimerización inicia con la formación de radicales libres generados por el persulfato de amonio, misma que es acelerada por el catalizador TEMED. (B) Representación simplificada de la estructura química de un hidrogel de poliacrilamida. Tanto la acrilamida como la bisacrilamida polimerizan conjuntamente, pero es la bisacrilamida la que establece ramificaciones entre las cadenas lineales de la poliacrilamida.

Es bien sabido que algunas vías de mecanotransducción están implicadas en la homeostasis del hígado. Entre ellas destaca la vía de Hippo, la cual ha sido ampliamente estudiada demostrando su participación como una vía maestra de la regulación del tamaño del hígado. Cuando se inhibe la vía de HIPPO mediante métodos genéticos se ha observado una hiperplasia descontrolada del órgano que

conlleva a la generación de cáncer hepatocelular [43,44]. Algunos GPCRs (receptores acoplados a proteínas G) son importantes mecanorreceptores vinculados a esta vía, ya que promueven la translocación del coactivador de la transcripción YAP1 (Yes associated-protein 1) al núcleo en donde regula la activación de diversos factores de transcripción [45]. Otra de las vías de señalización involucradas en la mecanotransducción es la de las proteínas cinasas ERK1/2, en cuya activación se ha advertido que la rigidez juega un papel importante [46]. Para la cascada de señalización ERK1/2, los mecanorreceptores involucrados son los RTKs (receptores tirosina cinasa) los cuales se activan ante la unión de factores de crecimiento secretados por células vecinas después de una lesión hepática. La unión del ligando activa (fosforila) a MEK 1/2 que a su vez activa (fosforila) a ERK 1/2 para regular la proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Por último, podemos mencionar la vía de Rho/ROCK, la cual, a través de la cinasa LIM (LIMK) inhibe a la cofilina, proteína que promueve la despolimerización de actina, favoreciendo así la estabilización de los filamentos de actina.

Cabe resaltar que la activación de estas vías de señalización puede ocurrir cuando las estructuras de unión entre hepatocito-hepatocito y hepatocito-MEC transmiten señales mecánicas a la célula ya sea por las fuerzas de tracción generadas por la contracción de células vecinas o bien por cambios en la composición de la MEC. Estas variaciones en la composición de la MEC inducen cambios conformacionales en los mecanorreceptores, conocidos como integrinas, transduciendo las fuerzas mecánicas en señales químicas dentro de la célula a través de proteínas que se unen al citoesqueleto de actina activando así una amplia gama de vías de señalización y programas genéticos para controlar la sobrevivencia, el destino y el comportamiento de las células. El estudio de las vías de mecanotransducción mencionadas en este apartado van más allá del alcance de este trabajo de tesis, sin embargo, se discutirán un poco más adelante para dar sustento a los hallazgos encontrados.

2.4.2 Proteínas de matriz extracelular

El hígado cuenta con una matriz extracelular única dentro del espacio de Disse, la cual separa a los hepatocitos del endotelio sinusoidal. Esta MEC hepática tiene una composición similar a la MB, pero contiene adicionalmente colágenas fibrilares (I y III), además de fibronectina y carece de la estructura electrodensa típica de la MB [47]. Su composición resulta indispensable para la viabilidad y la preservación de los hepatocitos y hay estudios que sugieren que los reordenamientos de la MEC modifican la composición y las propiedades mecánicas que dan como resultado programas específicos de desdiferenciación dentro de las células hepáticas, por lo que su incorporación en modelos *in vitro* podría ser clave para la preservación del fenotipo de hepatocitos primarios [41,48].

La MEC hepática se compone principalmente de colágena (tipo I, III, IV,), elastina, fibronectina, lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (**Figura 6**), los cuales proporcionan una plataforma física para las células, además de

estimular señales bioquímicas y biomecánicas. Así mismo, la MEC facilita funciones importantes, como la unión de factores de crecimiento y la interacción con receptores de la superficie celular para provocar la transducción de señales y regular la transcripción de genes [49,50]. Para ampliar la información a continuación se muestra una tabla con los principales componentes y sus funciones de la MEC hepática:

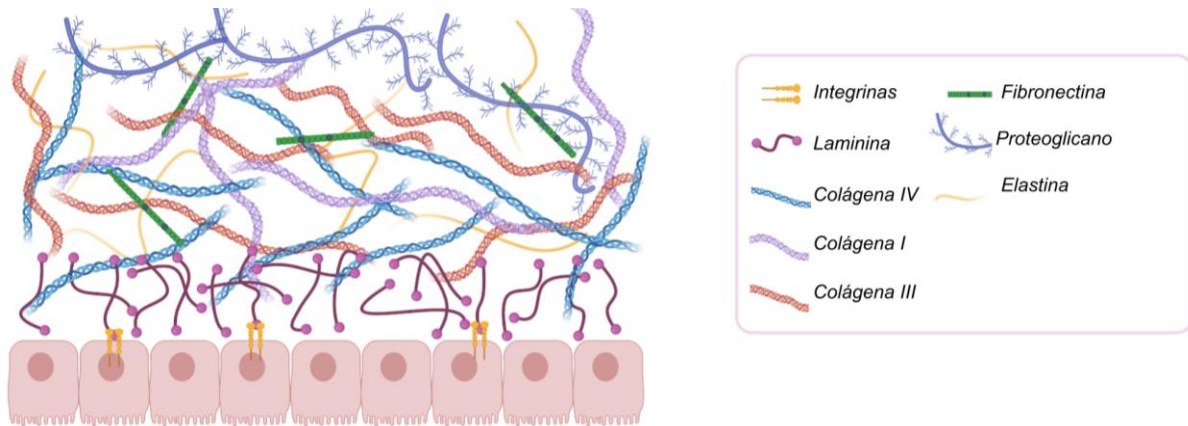


Figura 6. Matriz extracelular hepática. La MEC del hígado se encuentra ubicada en el espacio de Disse y posee la capacidad de regular algunas funciones de las células hepáticas. Tiene una composición que se semeja a la de la MB pero que contiene adicionalmente colágena tipo I, colágena tipo III y fibronectina. Estas proteínas en conjunto crean un andamio tridimensional que brinda soporte a los hepatocitos y permiten la señalización celular.

Tabla 2. Componentes estructurales de la MEC.

Componentes	Función
Colágenas	<ul style="list-style-type: none"> • Colágenas fibrilares: Las colágenas tipo I y III son las más abundantes de la MEC y su función es en gran parte mecánica, ya que proporcionan resistencia a la tracción del tejido. La colágena tipo I se encuentra enriquecida en los extremos y recubriendo la vasculatura del hígado, mientras que la colágena tipo III es la colágena más abundante en el espacio de Disse [51]. • Colágena reticular: La colágena tipo IV es el componente estructural más importante de la MB, es una molécula heterotrimérica que se agrega en redes filamentosas y se une a múltiples proteínas matricelulares. Es abundante en el espacio de Disse [51].
Fibronectina	<p>La fibronectina es una glicoproteína de alto peso molecular que se une a proteínas receptoras que atraviesan la membrana denominadas integrinas y componentes de la MEC como colágeno, fibrina y proteoglicanos de heparán sulfato. Tiene un papel importante en la adhesión, el crecimiento, la migración y la diferenciación de las células. La expresión, degradación y organización alterada de la fibronectina se asocia a eventos de fibrosis [51].</p>

Elastina	Es una proteína clave en la MEC que proporciona resiliencia y elasticidad al hígado. En asociación con la colágena tipo III forma la reticulina que mantiene la integridad estructural del hígado. La tinción con plata de la reticulina revela la arquitectura del hígado (normal, fibrótico o cirrótico) [52–54].
Lamininas	Son glicoproteínas que contienen dominios responsables de la interacción con las integrinas de la superficie celular. Las lamininas condicionan la diferenciación, migración y adhesión celular, así como el fenotipo y la supervivencia. De modo que su expresión está mayormente asociada al desarrollo del hígado, siendo no tan abundante en hígados maduros [51].

2.4.2 Co-cultivo de hepatocitos con células no parenquimatosas

Se sabe que la incorporación de células no parenquimatosas (NCP) con hepatocitos en modelos *in vitro* es esencial para desarrollar plataformas que tengan aplicaciones en el metabolismo de fármacos y modelos de enfermedades ya que estas células ayudan a regular la función hepática, además de contribuir, cuando así es requerido, a las respuestas inflamatorias mediante sus propias funciones especializadas. Dentro del hígado los hepatocitos comprenden el 60-65 % del total de las células hepáticas, mientras que las células NPC como las células endoteliales sinusoidales, LSEC (del inglés liver sinusoidal endothelial cell) comprenden el 16%, las células de Kupffer, KC (del inglés Kupffer cells) el 12% y las células estrelladas hepáticas, HSC (del inglés hepatic stellate cells) el 8%. Estas proporciones celulares han sido utilizadas para establecer cocultivos de hepatocitos en una relación de: Hepatocito:LSEC:KC:HSC de (10:2.7:2:1.3) [55].

Las LSEC ejercen un papel importante en el metabolismo de lípidos, la coagulación, el crecimiento celular, la diferenciación, la inmunidad y la respuesta inflamatoria. Las membranas de LSEC poseen numerosos poros abiertos llamados fenestras, que varían de 100 a 1000 nm de diámetro y se cree que actúan como un tamiz para las partículas transportadas por la sangre [56]. Las LSEC son eliminadores activos, que secretan citocinas tras la activación inflamatoria. Desafortunadamente, en cultivos *in vitro* la activación de células sinusoidales ocurre rápidamente provocando que las células se desdiferencien a un fenotipo microvascular (CD299-/CD31+), a menos que se cocultiven directamente con hepatocitos. En cocultivos con hepatocitos se ha demostrado que las LSEC estabilizan las funciones hepáticas como la secreción de urea y albúmina en periodos prolongados de cultivo. Las LSEC secretan factor de crecimiento de hepatocitos, HGF, e interleucina-6 en respuesta al factor de crecimiento endotelial vascular secretado por hepatocitos, protegiéndolos del daño tóxico [56]. Esto último es un claro ejemplo de cooperación entre hepatocitos y células no parenquimatosas que permiten una mejor respuesta celular y molecular por parte de los hepatocitos.

Por otro lado, las KC son los macrófagos residentes en el hígado, ingieren y degradan eritrocitos viejos, bacterias y diversas endotoxinas y juegan un papel importante en el metabolismo del hierro. Adicionalmente, las KC se han implicado en la toxicidad por fármacos y la lesión isquémica, al secretar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que agravan el daño hepático. Además, la participación de las células de Kupffer es indispensable en el proceso de fibrogénesis en el tejido hepático. La implementación de cocultivos de hepatocitos y KC, ya sean, en contacto directo o separados son capaces de imitar ciertos aspectos de la toxicidad por fármacos, haciéndolos muy útiles para la exploración e investigación de nuevos fármacos, así como modelos para el estudio de procesos de fibrogénesis hepática [56].

Las HSC son pericitos que almacenan vitamina A y controlan la perfusión sinusoide. Las HSC son las principales células productoras de matriz en el hígado y juegan un papel importante en la regeneración, diferenciación e inflamación. La activación de las HSC durante una cascada inflamatoria conduce a una rápida pérdida de función a medida que las células se diferencian en fibroblastos, lo que conduce a un aumento de la deposición de colágeno y fibrosis. No obstante, para estudios *in vitro*, la activación de las células estrelladas ocurre inmediatamente después de la siembra en placa y es impulsada por el estímulo mecánico [56].

Cabe destacar que, aunque los fibroblastos no se pueden usar para estudiar la fibrosis, sí apoyan la función de los hepatocitos en tiempos largos de cultivo. La línea celular de ratón 3T3-J2 es notablemente eficaz para mantener la función específica del hígado de los hepatocitos a través de una combinación de contactos célula-célula y sustancias difusibles de acción corta [56].

Como se puede apreciar, las interacciones entre los hepatocitos y otras células no parenquimatosas son clave para el mantenimiento de la homeostasis de los hepatocitos. Por ello, la incorporación de este tipo de células en cultivos primarios de hepatocitos lograría crear un mejor modelo que permita conservar la mayoría de sus funciones para estudios tóxico-farmacológicos.

2.4.3 Impacto de la formulación del medio de cultivo en la supervivencia y función de hepatocitos primarios cultivados

En estudios previos se ha demostrado que el tipo de formulación del medio modula la morfología y la función de los cultivos de hepatocitos de rata [57]. Esto se debe a que para conservar la función de los hepatocitos es importante tener la concentración intracelular adecuada de diferentes factores proteicos, moléculas extracelulares y moléculas aniónicas. Las concentraciones intracelulares de todos estos factores se ven afectadas de manera directa o indirecta por el medio extracelular, por su transporte al citoplasma y por su conversión dentro de la célula

[58]. Por ende, es importante lograr la formulación del medio óptimo que conserve la función, la morfología y proliferación de los hepatocitos primarios.

Entre los factores de diferenciación y crecimiento celular de los hepatocitos en medios de cultivo podemos destacar: el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), debido a su capacidad para promover la síntesis de ADN y para aumentar la producción de albúmina, la cual participa en el control de las condiciones osmóticas [59]. Asimismo, la producción de albúmina también se ve favorecida al suplementar el medio de cultivo con Insulina-Transferrina-Selenio (ITS), oncostatina M (OSM) e interleucina 6 (IL-6) [60].

La oncostatina M (OSM) es un miembro de la familia de la citocina IL-6. Es un potente inductor de proliferación, diferenciación y maduración de hepatocitos. Su uso en medio de cultivo favorece las funciones de los hepatocitos como: almacenamiento de glucógeno y actividad de algunos citocromos P450 y normalmente es utilizada en combinación con otros factores como el HGF [61–63]

Otros factores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo para promover la proliferación de los hepatocitos son el factor de crecimiento de fibroblastos y epidérmico (FGF y EGF, respectivamente). En particular, el EGF (del inglés epidermal growth factor), es utilizado en combinación con insulina y glucagón para promover la síntesis de ADN [64]. Como se ha mencionado, la proliferación y diferenciación de los hepatocitos se ven afectadas por señales extracelulares tales como citocinas y hormonas. Por ejemplo, los glucocorticoides modulan la proliferación y función de hepatocitos tanto *in vivo* como *in vitro*. La dexametasona (DEX), un glucocorticoide sintético, promueve la maduración de los hepatocitos al inhibir la producción de alfa feto proteína (AFP) y promueve la producción de albúmina, además de que protege a los hepatocitos de la apoptosis inducida por TNF- α [65]. Todos estos factores, ya sean solos o en combinaciones de dos o más son capaces de promover la supervivencia y función de hepatocitos primarios siempre y cuando sean utilizados en las cantidades o concentraciones adecuadas.

En el **Apéndice 1** de esta Tesis detallo a mayor profundidad la función de cada una de estas hormonas y factores de crecimiento, que son parte de la formulación de algunos medios, además comparo las concentraciones utilizadas de acuerdo con el modelo de cultivo empleado por el grupo de investigación.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El uso de sustratos suaves conjugados con proteínas de MEC en combinación con un medio de cultivo óptimo favorecerá la preservación del fenotipo y función de los hepatocitos primarios por periodos prolongados de tiempo.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la influencia de proteínas de matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento en la preservación del fenotipo y función de cultivos de hepatocitos primarios.

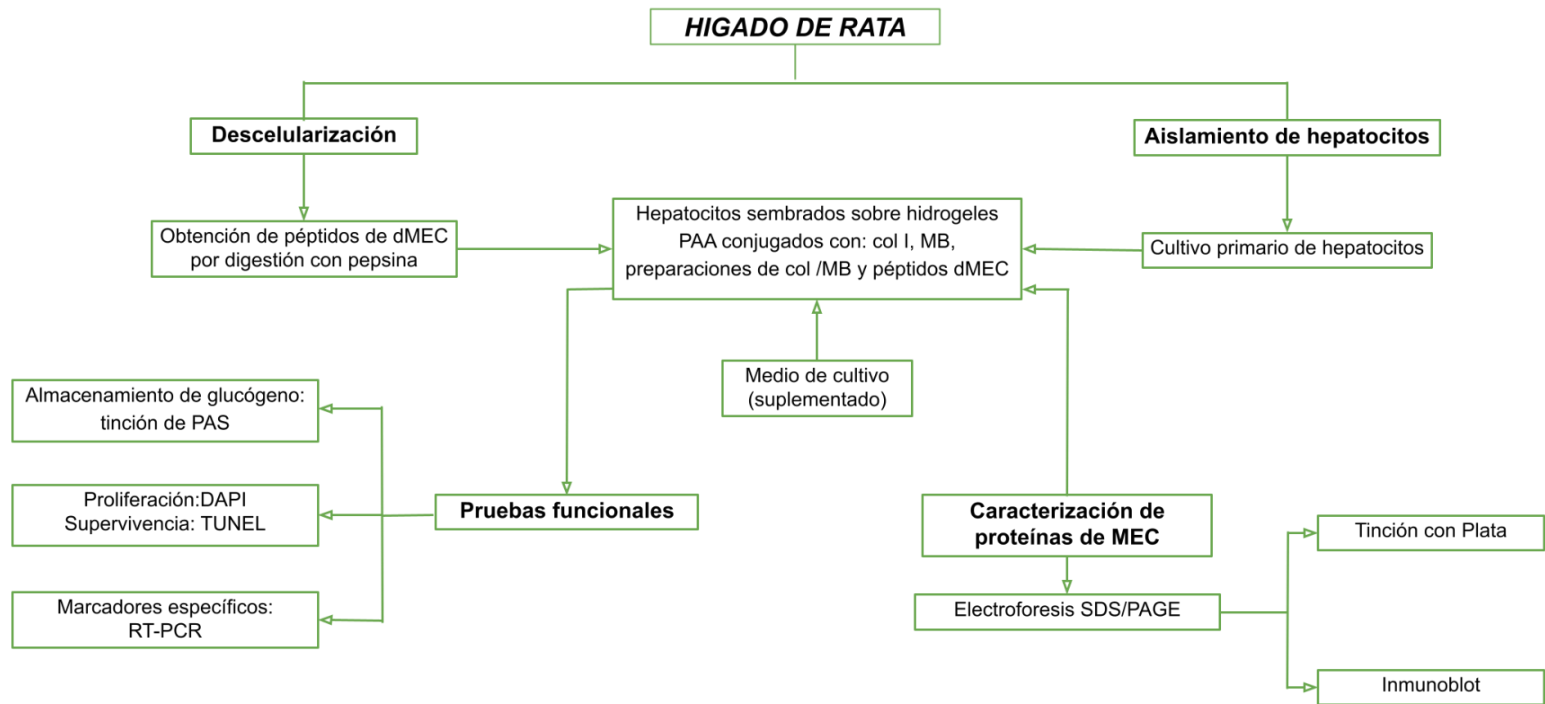
OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las proporciones idóneas de proteínas de MEC, así como de proteínas de matriz asociadas a MB a hidrogeles de poliacrilamida que permitan la adhesión y supervivencia, así como también la función metabólica de cultivos *in vitro* de hepatocitos cultivados *in vitro* por periodos de tiempo prolongados.
- Extraer proteínas de matriz extracelular a partir de hígados descelularizados, incorporarlas a hidrogeles de poliacrilamida para finalmente evaluar la adhesión y supervivencia de hepatocitos cultivados por periodos de tiempo prolongados.
- Establecer el efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF), en la supervivencia y agregación de hepatocitos primarios en diferentes condiciones de cultivo.
- Diseñar diversos oligonucleótidos, que en un futuro serán utilizados para detectar los niveles de expresión de marcadores específicos de identidad y función hepática, tales como albúmina, el factor nuclear 4 alfa de hepatocito (HNF4 α) entre otros, en las condiciones de cultivo estudiadas en esta tesis.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diagrama general de las técnicas utilizadas en el presente trabajo de tesis



4.2 Reactivos y equipos

Tabla 3. Reactivos e instrumentos utilizados durante la realización de este estudio.

REACTIVOS		EQUIPOS
HEPES	TEMED	Liofilizadora BENCHTOP PRO Virtis SP Scientific®
NaCl	Acrilamida	Centrífuga Eppendorf 5804R
KCl	Bisacrilamida	Microcentrífuga Sorvall Legend Serie micro 17R
KH ₂ PO ₄	Éster de ácido acrílico-NHS	Fuente de alimentación EC1000
CaCl ₂	Ácido acético glacial	Microscopio invertido Eclipse Ti-S (Nikon Tokio, Japón)
MgSO ₄	Na ₂ CO ₃	Microscopio de fluorescencia Eclipse (Nikon)
APTES	Na ₂ S ₂ O ₃	Incubadora de CO ₂ Air Jacketed modelo AAC80T
Triton-X 100	Formaldehído	Baño María Thermo Scientific
NH ₄ OH	Paraformaldehído	Campana de flujo laminar Biotech SC1300 A-2-X
MgCl ₂	Ácido peryódico	Campana de extracción modelo ALVA
Glutaraldehído	Reactivo de Schiff	Bomba peristáltica. Masterflex L/S easy-load modelo 77200-60
APS	Matrigel®	BAÑO ULTRASÓNICO SB-1200DTN
Colagenasa tipo IV	Colágena tipo I de cola de rata	

4.3 Aislamiento de hepatocitos

Los hepatocitos fueron aislados a partir de hígados de ratas Wistar macho jóvenes, con un peso aproximado de 250 g, utilizando el método de perfusión de colagenasa modificado de Berry y Friend [66]. Una vez anestesiadas las ratas con aproximadamente 0.5 mL de pentobarbital, fueron sometidas a una laparotomía para

tener acceso al hígado. Una vez expuesto el hígado, se canuló por la vena porta y fue perfundido, a un flujo de 8.0 mL/min, con una solución amortiguadora libre de Ca^{2+} (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, HEPES 10 mM, pH 8.5) durante 20 min, seguido de una solución amortiguadora con Ca^{2+} y colagenasa (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, HEPES 10 mM, pH 8.5 CaCl_2 3 mM y MgSO_4 1.2 mM) durante aproximadamente 10 min con el objetivo de digerir el tejido. Posteriormente, el hígado se disgregó en porciones más pequeñas para facilitar su filtración y separarlo de las partes no digeridas para iniciar el proceso de aislamiento de células parenquimales (hepatocitos). Una vez aislados los hepatocitos, fueron separados por centrifugación a 400 rpm durante 2 min y lavados cuatro veces con medio E de Williams con el objetivo de remover las células no parenquimatosas. Los hepatocitos viables, aislados mediante centrifugación con Percoll (solución 1:1, v:v, suspensión celular / Percoll 90%), fueron cuantificados mediante el método de exclusión por captación de azul de tripán, con la ayuda de un hemocitómetro. Finalmente 250,000 hepatocitos fueron sembrados en placas de 12 pozos, la cual es la densidad óptima para evitar la saturación y por consiguiente la formación de agregados de hepatocitos que no se adhieren correctamente al sustrato.

4.4. Cultivo y mantenimiento de hepatocitos

Los hepatocitos frescos, recientemente aislados, se resuspendieron en medio de adhesión (DMEM-F12 suplementado con GlutaMAX, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM, anfotericina B 0,5 μg / ml, selenito de insulina-transferrina-sodio y suero bovino fetal (FBS) al 10% más antibióticos) y se sembraron a una densidad de 2.5×10^5 células y se dejaron adherir durante 2-4 h en cubreobjetos redondos de 20 mm con hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa y 20 kPa adheridos a la superficie. Una vez transcurrido el tiempo de adhesión, (aprox. 3 h) los hepatocitos se mantuvieron en medio feeding (medio de adhesión sin FBS) en condiciones de cultivo estándar de CO_2 al 5% y temperatura de 37°C . Las imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) fueron capturadas por el microscopio Nikon Eclipse Tí-S.

4.5 Descelularización del hígado y digestión por pepsina y colagenasa.

Las fracciones digeridas de matriz extracelular, utilizadas en este proyecto, se obtuvieron de ratas Wistar jóvenes con un peso ~ 250 g. Las ratas anestesiadas con pentobarbital se sometieron a una laparotomía ventral. Para disminuir la coagulación sanguínea se inyectaron 0.2 ml de heparina 1000 U/ml en la vena cava inferior. Posteriormente, se canuló la vena porta y se hizo perfundir agua desionizada previamente enfriada y desgasificada por sonicación a 5 ml/min durante 30 min. Una vez lavados los hígados se perfundieron con solución de descelularización desgasificada (Tritón-X 100 al 1%, NH_4OH al 0,1%, (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) DNAsa I pancreática bovina y (1 mM) MgCl_2 y se hizo recircular durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las matrices extracelulares descelularizadas (dMEC) se lavaron

perfundíendolas con agua desionizada durante al menos 4 h para así asegurar la eliminación de restos de componentes celulares. Las matrices decelularizadas se guardaron a -70°C . Posteriormente se liofilizaron de 12 a 24 h. Una vez liofilizadas las dMEC, se pulverizaron con ayuda de NO_2 líquido. 10 mg de dMEC pulverizado se digirieron con 1 mg/mL de pepsina gástrica bovina en una solución 0.1 N HCl o con 0.5 mg/mL de colagenasa tipo IV en solución HBSS (Ca^{++} al 2.5 mM, (-) NaHCO_3 (-) Rojo de fenol) en agitación constante a 30 rpm a temperatura ambiente. Los péptidos se recuperaron a las 2 y 48 h después de la digestión, estos extractos se neutralizaron con NaOH (10 N), con el objetivo de detener la actividad de la pepsina. Estas muestras se centrifugaron a 13,300 rpm durante 10 min a 4°C . Se descartó la fracción insoluble y los sobrenadantes se almacenaron a -70°C antes de su uso.

4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), tinción e inmunoblot de proteínas de MEC

La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el kit de cuantificación de proteínas de BIO-RAD, el cual es una variante del método de Lowry. Primero se realizó una curva patrón a base de albúmina de suero bovino (BSA) con las concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mg/mL. Para la elaboración de la curva se añadieron los reactivos del kit en el siguiente orden: 25 μL de la solución A, 5 μL la disolución de BSA y por último se añadió 200 μL de la solución B. Una vez homogenizada la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 750 nm. La cuantificación de los extractos de dMEC se realizó de la misma manera. Para la electroforesis de geles de poliacrilamida al 8-15%, se cargaron 20 μg de colágena tipo I, Matrigel® y combinaciones de colágena/Matrigel® y extractos de dMEC.

Para la tinción con plata, los geles de poliacrilamida se incubaron en una solución de fijación (50% de metanol, 12% de ácido acético glacial y 0,5% de formaldehído) durante 1.5 h y se realizaron 2 lavados con agua desionizada. Una vez que las proteínas se fijaron, los geles de poliacrilamida se lavaron 3 veces en una solución de metanol al 50% durante 10 min y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente, se realizó una reacción de oxidación incubando con 0.004% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ durante 35 s con dos lavados posteriores de agua desionizada durante 20 s. Más adelante, se llevó a cabo una reacción de impregnación utilizando una solución que contenía 0.2% de AgNO_3 y 0.75% de formaldehído durante 3 min. Finalmente se lavó 2 veces con agua desionizada. El progreso de la reacción se detuvo aproximadamente a los 10 s con una solución al 6% de Na_2CO_3 , 0.004% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ más 0.5% de formaldehído. Después, los geles de poliacrilamida se lavaron 2 veces durante 10 s con agua desionizada y se les colocó solución de fijación para detener por completo la reacción. Todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante. Mientras que para la tinción de Coomassie Brilliant Blue R-250 los geles se incubaron en una solución de tinción previamente filtrada (0.25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 90% de una solución 1:1 de metanol/agua y 10% de ácido acético glacial)

durante 1.5 horas. Transcurrido el tiempo se hacen 2 lavados con una solución desteñidora (90% de solución 1:1 metanol agua y 10% de ácido acético glacial), para después dejar los geles en dicha solución por periodos de 2 a 3 h realizando recambios de la solución hasta obtener un contraste adecuado entre las bandas de proteínas y fondo (*background*) del gel. Todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante.

La detección de colágena tipo I se hizo mediante la técnica de inmunoblot. Brevemente, los extractos proteicos fueron resueltos por electroforesis en un gel de poliacrilamida, para posteriormente ser transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana es incubada (bloqueo) durante 1 hora con leche (baja en grasa) al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,1%). A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario contra la colágena tipo I en una dilución de 1:2000 en agitación durante toda la noche a 4°C. Después de varios lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) contra la cadena ligera de inmunoglobulina G (IgG) de ratón a una dilución de 1:10,000 durante 1 h en condiciones de bloqueo a temperatura ambiente. Para la detección de proteínas, se utilizó el sustrato de quimioluminiscencia ECL, Merck Millipore, MA, USA.

4.7 Preparación y conjugación de hidrogeles

Para el depósito de los hidrogeles en cubreobjetos (20 mm de diámetro) es necesario funcionalizarlos. Para ello, en cada cubreobjeto se colocaron 700 µl de NaOH 1 M por 3 min, seguido de 700 mL de APTES (concentrado) también por 3 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con agua desionizada y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con 700 µl de glutaraldehído al 5%. Los cubreobjetos se lavaron 3 lavados de 10 min con agua desionizada y se secaron para su posterior uso.

La preparación de hidrogeles, así como la medición de sus propiedades elásticas por microindentación se realizaron de acuerdo con estudios previos hechos en nuestro laboratorio [41,42,67]. Para la realización de hidrogeles se mezclaron cantidades específicas de acrilamida al 40% y bis-acrilamida al 2% que fueron depositadas en cubreobjetos previamente funcionalizados. Posteriormente, a la mezcla se adicionaron persulfato de amonio al 10%, para la generación de radicales libres, así como TEMED al 1 % para catalizar la reacción de polimerización. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y tomó alrededor de 30 min. Después de la polimerización, se añadieron éster de ácido acrílico-NHS 1.7 mg/ml) e Irgacure 2959 (11 mg/ml) a preparaciones tanto de colágeno de rata tipo I, Matrigel®, péptidos de dMEC, así como de mezclas colágeno/Matrigel® para ser conjugados con los hidrogeles. El fotoiniciador Irgacure 2959 permite la formación de radicales libres de oxígeno en el agua una vez activado por la luz UV. Para ello, las mezclas son expuestas a luz ultravioleta (longitud de onda de 365 nm con una densidad de

potencia nominal de 3,3 mW / cm²) durante 3 minutos. Para cada una de las condiciones de conjugación utilizadas, la concentración final fue de 0.1 mg/ml, como en [68]. Finalmente, los hidrogeles conjugados con proteínas de matriz extracelular fueron lavados con una solución de fosfato salino de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1X) en presencia de antibióticos.

4.8 Ensayo de TUNEL

El ensayo TUNEL (por sus siglas en inglés; Terminal dUTP Nick-End Labeling) etiqueta las células apoptóticas modificando el ADN genómico fragmentado utilizando desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para la detección de células positivas mediante tinción específica. Los hepatocitos se lavaron con DPBS 1x previamente calentado e inmediatamente se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en DPBS 1x a 37°C durante 20 min. Una vez fijos, los hepatocitos se permeabilizaron con una solución preenfriada de etanol y ácido acético (2:1) durante 5 min a -20°C. Posteriormente los hepatocitos se lavaron 2 veces durante 5 min con DPBS 1x e inmediatamente se añadieron 75 µL/5 cm² de buffer de equilibración directamente sobre la muestra durante 10 s. Este buffer se retiró y se añadieron 55 µL/5 cm² de la enzima TdT, las muestras se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se colocó un buffer de arresto en las muestras durante 10 min a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:200) en DPBS 1x y las muestras se montaron con Mowiol para su conservación antes de la obtención de imágenes.

4.9 Obtención de lisados totales e inmunoblot para la detección de ERK 1/2

Para la detección de ERK 1/2 y p-ERK 1/2, los hepatocitos cultivados en hidrogeles de poli(acrilamida) se lavaron con DPBS 1x preenfriado y se lisaron con 0,5 ml de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS y 1% de Nonidet) en combinación con un cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasa (Complete™) en agitación durante 2 h a 4 °C. Los lisados se centrifugaron a 13,300 rpm durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se realizó la cuantificación, separación por electroforesis (carga: 50-75 µg) e inmunoblot como se describe en el apartado 4.6. Para el inmunoblot se utilizaron los anticuerpos primarios contra fosfo-p44/42 y ERK 1/2, y el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa contra la cadena ligera de inmunoglobulina G (IgG) de conejo.

4.10 Detección de glucógeno

La presencia de glucógeno en las diferentes condiciones de cultivo de hepatocitos se determinó por medio de la tinción de PAS (Periodic acid–Schiff, por sus siglas en inglés) también conocida como tinción de Schiff. Hepatocitos frescos se sembraron en placas de 12 pozos y se dejaron crecer durante uno y cinco días;

posteriormente, se fijaron a 37°C con paraformaldehído (PFA) al 4% por un tiempo aproximado de 15 min. Posteriormente, los hepatocitos se lavaron con DPBS 1X y se incubaron con solución de ácido peryódico al 1% en agua desionizada durante 5 min para después teñirlos con reactivo de Schiff durante 15 minutos. Los lavados y la tinción de los hepatocitos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, exceptuando la fijación con PFA.

4.11 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda y el alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los transcritos de las especies humano, rata y ratón de algunos genes de zonación hepática de interés (Gys2, F7, Baat, etc.). Se usaron las plataformas NCBI gene y Clustal Omega, respectivamente, con la finalidad de identificar regiones homólogas y diseñar oligonucleótidos con la intención de amplificar regiones de genes por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). El manejo de las secuencias se hizo con la ayuda del programa SnapGene Viewer.

4.12 Adquisición y análisis de imágenes

La adquisición de imágenes se realizó por microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia haciendo uso del Microscopio invertido Eclipse Ti-S Nikon y del Microscopio de fluorescencia Eclipse (Nikon) respectivamente. El análisis y procesamiento de imágenes se hizo con el software ImageJ. Todas las condiciones evaluadas se hicieron por duplicado (2 experimentos independientes) y se tomaron como mínimo 10 imágenes para cada condición. Para los análisis cuantitativos de área primero se seleccionó la imagen a analizar y en la barra de herramientas del programa **Image** se seleccionó la opción **Type** y ahí en la opción **16-bit**. Para delimitar el área celular y el área de agregados se utilizó la herramienta para delimitación manual (**polygon selections**), dibujando el contorno de células individuales y/o agregados celulares con un área mínima de 2000 μm^2 . Una vez delimitada el área, se seleccionó en la barra de herramientas a través del comando **Analyze** en donde aparece la opción **Measure**, la cual arroja los valores correspondientes del área seleccionada. Dichos resultados se guardan para su posterior análisis y representación gráfica. Para el dibujo del contorno de las células individuales o agregados celulares se consideró todo el campo de la fotografía. Para la cuantificación de células apoptóticas se seleccionaron las imágenes correspondientes al reactivo de TUNEL y a los núcleos marcados con DAPI. Lo primero que se hizo fue hacer una corrección de contraste de las imágenes con la ayuda de los comandos **Image** y **Adjust**. Hecho esto, se seleccionó la opción **color** dentro de la pestaña **Image** para finalmente seleccionar el comando **Merge channels**. Finalmente, haciendo uso de la función **Multi-point**, todas aquellas células que fueron positivas al reactivo de TUNEL (verde), así como también al DAPI (azul) núcleos color aqua (**Figura 11**), fueron cuantificadas. Para este análisis se consideró todo el campo de

la fotografía. Finalmente, para los estudios de proliferación, la cuantificación de los núcleos (marcados con DAPI) se delimitó un área de $5.23 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de las fotografías seleccionadas. Dicha cuantificación se hizo con la ayuda de la herramienta **Multi-point**.

4.13 Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente haciendo uso del análisis de varianza (ANOVA) unifactorial y pruebas de comparación de Tukey con el programa GraphPad Prism 9. Para la significancia estadística, $p < 0.05$ se consideró significativo.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Obtención y caracterización de péptidos de MEC a partir de hígado de rata

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de proteínas de matriz extracelular, incorporadas en hidrogeles de poliacrilamida, en la adhesión y supervivencia de hepatocitos cultivados; por lo que lo primero que realizamos fue la estandarización de la obtención de proteínas de matriz extracelular a partir de hígados descelularizados. La descelularización de tejidos u órganos se ha explorado como una estrategia interesante para la fabricación de andamios funcionales para cultivos *in vitro*. Estudios anteriores indican que métodos químicos como el tratamiento con ácidos y bases y el uso de detergentes iónicos y no iónicos son los métodos por excelencia para la eliminación de componentes celulares de órganos completos, siempre y cuando estén en concentraciones adecuadas que no comprometan la integridad de la MEC [69,70]. La obtención de la MEC de órganos es clave para la fabricación de andamios *in vitro*, ya que se ha comprobado que las proteínas que la componen tienen la capacidad de imitar el microambiente de los tejidos nativos y por lo tanto podrían promover la adhesión, el mantenimiento del fenotipo, la supervivencia y la proliferación de las células [71]. Para obtener proteínas de MEC hepática y evaluar su impacto en cultivos de hepatocitos primarios *in vitro* primero se realizó la descelularización de varios hígados de rata como se describe en el apartado 4.5, utilizando la siguiente solución descelularizadora: Tritón X-100 (detergente no iónico), NH₄OH, DNAsa y MgCl₂. Después de 24 h de perfusión, el hígado es lavado hasta tornarse translúcido, indicativo de que ha quedado sin material celular (**Figura 7A**).

Una vez obtenida, la MEC hepática es liofilizada y pulverizada para su posterior digestión. Para ello empleamos la enzima pepsina, ya que la obtención de péptidos de MEC mediante el uso de proteasas ha demostrado ser un método eficaz. Un grupo de investigación especializado en cardiomiocitos demostró que los extractos de péptidos provenientes de la MEC a tiempos cortos de digestión contienen predominantemente derivados de proteínas poco reticuladas como las lamininas, semejando proteínas de la membrana basal, mientras que los que se obtienen a tiempos relativamente largos contienen predominantemente derivados de proteínas fibrilares como la colágena tipo I [72]. Tomando como base este estudio, la MEC hepática fue digerida a diferentes tiempos con el objetivo de observar el enriquecimiento de péptidos de matriz. Cabe señalar que los precursores de la colágena tipo I son proteínas compuestas por 3 cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α (dos cadenas α_1 y una cadena α_2) enrolladas juntas formando una triple hélice. Los intervalos de peso molecular de estas cadenas de procolágena son de ~140-200 kDa, mientras que el peso molecular de la colágena tipo I heterotrimérica es de ~250 kDa [73]. Para detectar e identificar, por medio de tinción de plata, la presencia de péptidos de matriz extracelular, las muestras fueron separadas previamente por electroforesis en geles de poliacrilamida (véase la sección 4.6). En los péptidos obtenidos por digestión con pepsina se observó un evidente

enriquecimiento diferencial, sobre todo a tiempos de digestión más largos (**Figura 7B**). Presumiblemente, las bandas correspondientes a los pesos en 140-200 kDa corresponden a las cadenas de procolágena.

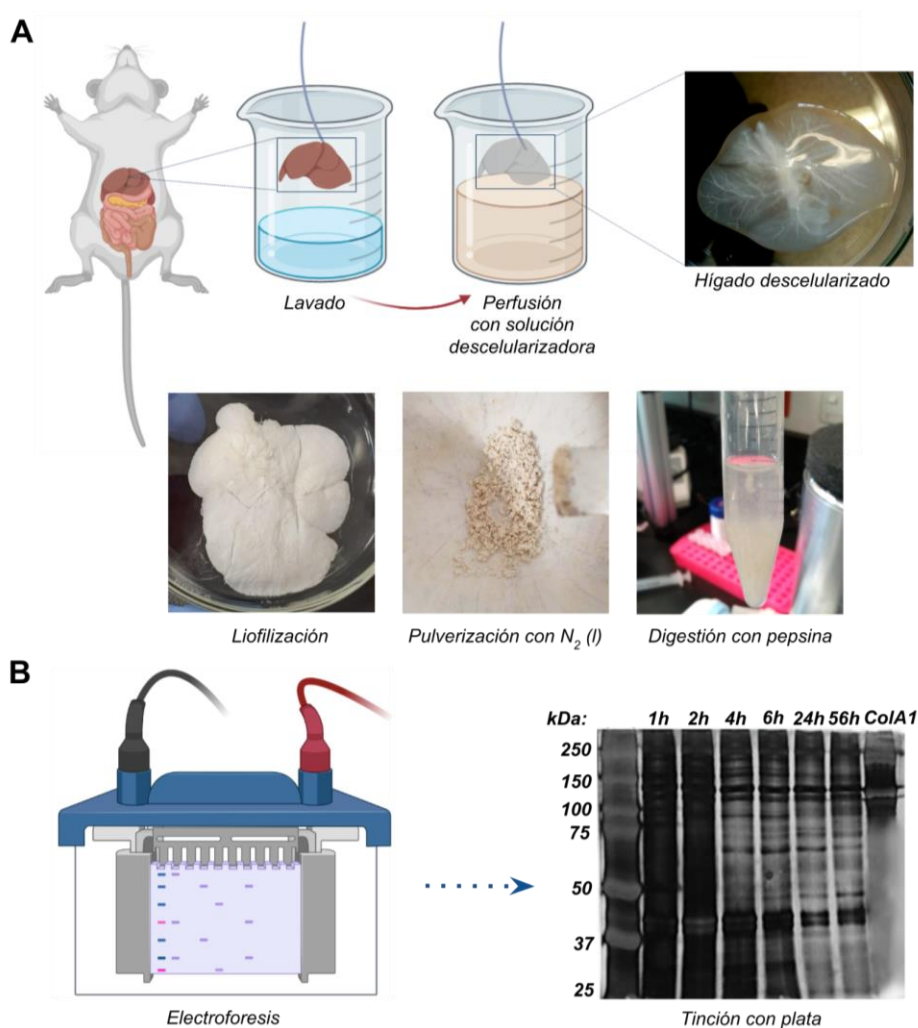


Figura 7. Metodología para la obtención y caracterización de proteínas de matriz extracelular a partir de hígados descellularizados. (A) Procedimiento general para la descellularización del hígado. El hígado se perfunde a través de la vena porta con agua desionizada y posteriormente con la solución descellularizadora. Transcurridas 24 h, el hígado es lavado para eliminar cualquier exceso de la solución descellularizadora y se guarda a -70°C para su posterior liofilización. Una vez liofilizado el hígado se pulveriza con ayuda de N_2 líquido para que la digestión con pepsina se lleve a cabo de manera homogénea. (B) Imagen representativa de la separación de péptidos de MEC por electroforesis SDS-PAGE y de la tinción del gel mediante la técnica de tinción de plata. La imagen muestra los péptidos obtenidos por digestión con pepsina a diferentes tiempos comparados con colágena tipo I (último carril derecho).

5.2 La colágena tipo I promueve la adhesión celular y agregación de hepatocitos de rata a sustratos suaves de poliacrilamida. Sustratos rígidos incrementan el área celular de los hepatocitos primarios cultivados.

Para generar el microambiente biomimético adecuado en cultivos *in vitro* de hepatocitos primarios es importante considerar las propiedades bioquímicas y mecánicas a las que responden las células en el órgano intacto, ya que estas modulan funciones esenciales de las células como la adhesión, la diferenciación, el crecimiento, la supervivencia, la motilidad y la contractilidad [38,74]. Otro objetivo de mi tesis fue evaluar la respuesta de los hepatocitos a las propiedades mecánicas utilizando hidrogeles de poliacrilamida, los cuales han demostrado ser un excelente andamio celular debido a su capacidad de imitar elementos cruciales de la MEC nativa, además de ofrecer la ventaja de poder modular de manera reproducible su rigidez [75]. Diversos estudios reportan que la rigidez de un hígado sano se sitúa entre un intervalo de 150-1000 Pa y que la rigidez de un hígado fibrótico es regularmente mayor a 1 kPa [37]. En este estudio, fabricamos hidrogeles de 1 y 20 kPa, con la finalidad de representar, por un lado, la rigidez de un hígado sano y de otro en condiciones patológicas. Los hidrogeles fabricados se entrecruzaron con colágena tipo I (proteína que ha demostrado promover la adhesión celular de cultivos de hepatocitos primarios) y evaluamos el impacto de la rigidez en función de la morfología de los hepatocitos. En cultivo en monocapa, los hepatocitos primarios generalmente presentan una morfología que se caracteriza por células cuboidales con núcleos ligeramente visibles. Este fenotipo principalmente es observado en periodos de cultivo cortos (básicamente un día) y refleja más fielmente a un hepatocito en un órgano intacto ya que después pasado este tiempo los hepatocitos comienzan a desdiferenciarse y las pruebas toxi-farmacológicas que se hagan en ellos ya no reflejan de manera fidedigna a aquellas funciones que se encontraría en un hígado intacto, de ahí la importancia de encontrar estrategias que puedan prolongar un fenotipo diferenciado de los hepatocitos [37,76]. Nuestros resultados (**Figura 8A**) demostraron que los hepatocitos cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida suaves y rígidos mostraron forma redondeada con núcleos visibles a las 24 h de cultivo, y muy importantemente esta morfología se conservó a las 72 h de cultivo en condiciones suaves, además de que los hepatocitos comenzaron a formar agregados celulares. De manera opuesta, en condiciones rígidas, los hepatocitos no conservaron su morfología después de 72 h de cultivo, en cambio se mostraron menos redondeados y más alargados (**Figura 8A** panel inferior izquierdo). El cambio en la morfología y por consiguiente en el área celular se confirmó mediante el análisis cuantitativo. En condiciones suaves (1 kPa), el área celular de los hepatocitos, un poco más pequeña, se mantuvo hasta las 72 h de cultivo, mientras que en condiciones rígidas (20 kPa) el área celular de los hepatocitos, respecto a las otras condiciones, aumentó de manera significativa (~1.6 veces) a períodos más largos de cultivo (72 h) (**Figura 8B**).

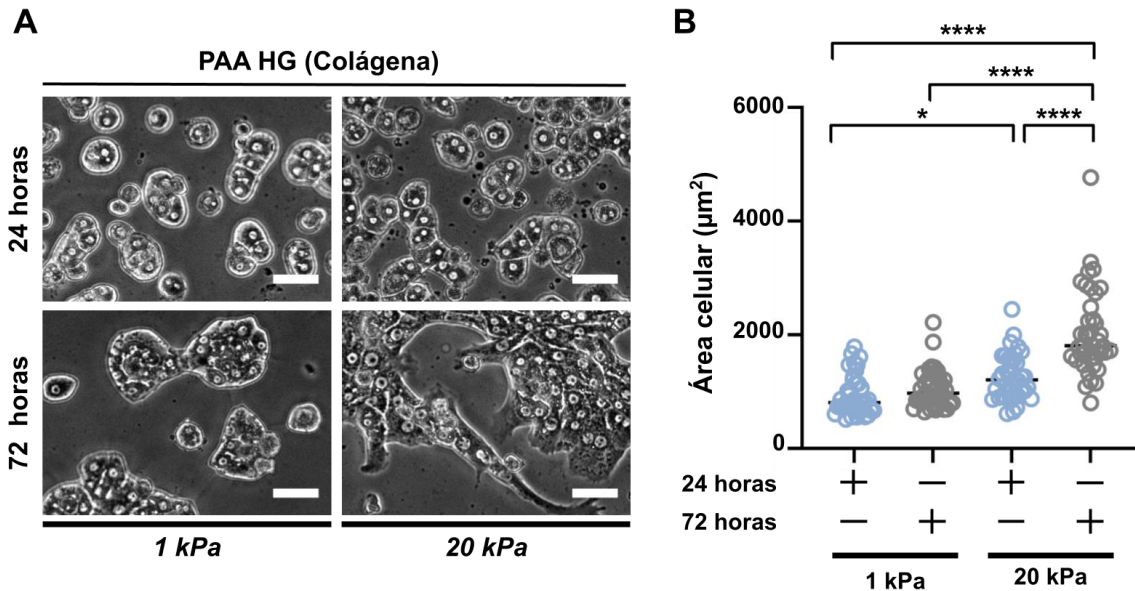


Figura 8. Efecto de la rigidez del sustrato en el área celular de hepatocitos cultivados. Sustratos suaves favorecen la preservación del fenotipo hepático a periodos largos de tiempo. (A) Imágenes representativas de hepatocitos cultivados sobre hidrogel de poliacrilamida de 1 y 20 kPa entrecruzados con colágena tipo I a las 24 y 72 h de cultivo. (B) Análisis cuantitativo del área celular de los hepatocitos primarios cultivados en las condiciones ya mencionadas. Los datos son representados como la media \pm la desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican significancia para $P < 0.05$. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio invertido *Eclipse Ti-S* utilizando un objetivo de 20X. Barra de escala 50 μm .

Como se mencionó anteriormente, las células respondieron a las propiedades bioquímicas y mecánicas de su microambiente, por lo que para evaluar en conjunto dichas propiedades consideramos la composición de la MEC hepática. Recordemos que la MEC hepática se compone de proteínas asociadas a la MB (laminina, elastina, colágena tipo IV, etc.) y de proteínas fibrilares (colágenas tipo I y tipo III), que en conjunto permiten la señalización celular, de modo que estas proteínas están involucradas en la adhesión, la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia de los hepatocitos [47,77,78]. Estudios previos reportan que el uso de las proteínas individuales no promueve el mantenimiento del fenotipo de los hepatocitos ya que las funciones varían de acuerdo con la proteína utilizada [77]. Anterior a este trabajo de tesis, la estudiante Sagrario Avin Hernández estudió la incorporación, individual y en combinación, de proteínas asociadas a la MB (laminina y colágena tipo IV) en hidrogel de poliacrilamida suaves, sin embargo, en ninguna de estas condiciones los hepatocitos se adhirieron correctamente, siendo la condición con colágena tipo IV la menos eficiente (datos no mostrados). Ante este problema propusimos la incorporación del conjunto de proteínas a hidrogel de poliacrilamida mediante dos métodos: 1) La incorporación de combinaciones de colágena tipo I y Matrigel® (combinación de proteínas de MB: 60% laminina, 30% colágena tipo IV y 8% entactina) al cual nos referiremos como MB, y 2) La incorporación de extractos de péptidos a partir de órganos descelularizados (dMEC).

Para determinar las proporciones idóneas de proteínas de MEC establecimos las siguientes combinaciones de colágena/MB: 100% colágena, 75% colágena con 25% MB, 50% colágena con 50% MB y 100% MB. Mediante tinción con plata e inmunoblot confirmamos las cantidades crecientes de colágena tipo I (**Figura 9A**). La MB no mostró presencia de colágena tipo I (**Figura 9A**, último carril) lo que nos permitió evaluar de manera individual el efecto que pudiera tener la colágena tipo I y la combinación de ésta con proteínas de MB. Una vez hecho esto, se fabricaron hidrogeles de poliacrilamida de 1 y 20 kPa y se entrecruzaron con las combinaciones establecidas para el cultivo de hepatocitos primarios. Los hepatocitos se adhirieron correctamente en todas las condiciones evaluadas a las 24 h de cultivo (**Figura 9B**). Sin embargo, en hidrogeles suaves entrecruzados sólo con proteínas de MB se observaron cuerpos apoptóticos (cabeza de flechas amarillas), resultando en una disminución en el número de células a las 72 h de cultivo. Adicionalmente, en condiciones suaves y en presencia de colágena tipo I (100, 75/25, 50/50), los hepatocitos se organizaron en agregados celulares elongados, similares a cordones hepáticos. No obstante, dicha organización fue mayor en la condición de 100% de colágena (**Figura 9B**).

De manera contraria, los hepatocitos cultivados en hidrogeles rígidos entrecruzados con todas las combinaciones de colágena/MB se organizaron principalmente en agregados. Adicionalmente, a las 72 h de cultivo los hepatocitos primarios cambiaron su morfología, es decir se transformaron a un tipo mesenquimal, y su área celular se vio significativamente aumentada (**Figura 9B**). Por otro lado, hepatocitos individuales fueron más abundantes en hidrogeles blandos conjugados con proteínas asociadas a la MB.

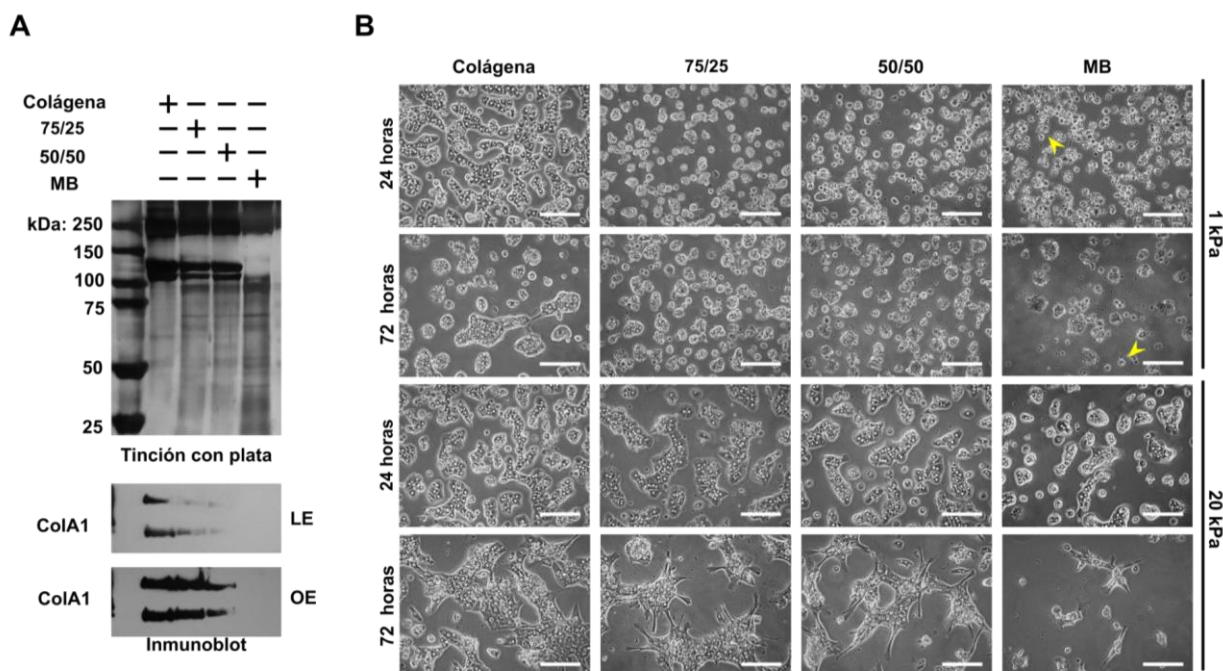


Figura 9. La colágena tipo I en hidrogeles de poliacrilamida promueve la adhesión y viabilidad de los hepatocitos primarios. (A) Caracterización de colágena tipo I y proteínas de matriz asociadas a la membrana basal a distintas combinaciones, a través de tinción con plata e inmunoblot. Las diferentes combinaciones de proteínas fueron separadas por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). LE, membranas de baja exposición; OE, membrana sobreexpuesta. (B) Hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa y 20 kPa conjugados con combinaciones de colágena tipo I y proteínas de MB a las 24 y 72 h de cultivo. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 20X utilizando el microscopio invertido Eclipse Ti-S. Barra de escala: 500 μ m. Las cabezas de flechas amarillas señalan la presencia de cuerpos apoptóticos.

A continuación, quisimos explorar el papel de péptidos provenientes de proteínas de matriz extracelular a partir de hígados descelularizados conforme a lo anteriormente estudiado en el apartado 5.1. Para ello, digerimos las dMECs durante un periodo corto de 2 h y durante un periodo prolongado de 48 h con el objetivo de evaluar el enriquecimiento proteico de los extractos obtenidos. A través de la tinción con azul de Coomassie y la tinción con plata evaluamos el enriquecimiento de péptidos de dichas condiciones, observando un enriquecimiento diferencial respecto al tiempo de digestión (**Figura 10A**) como el ya reportado anteriormente en el apartado 5.1 (**Figura 7C**). Hecho esto, de manera similar al experimento anterior, fabricamos hidrogeles de poliacrilamida de 1 y 20 kPa que se entrecruzaron con los extractos obtenidos a las 2 y 48 h de digestión. Los hepatocitos se mostraron correctamente adheridos en ambas condiciones a las 24 h de cultivo. Los hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves entrecruzados con extractos de dMEC a 2 h de digestión mostraron similitudes a los cultivados en hidrogeles entrecruzados con MB, es decir no formaron agregados celulares tipo cordones hepáticos además de mostrar la presencia de cuerpos apoptóticos (cabeza de flechas amarillas, **Figuras 10B y 10C**) a las 24 h de cultivo, lo que como consecuencia llevó a una disminución en el número de células (**Figura 10B**). En contraste, los hepatocitos cultivados en

hidrogeles suaves entrecruzados con dMEC 48 h mostraron similitudes con los cultivados en los hidrogeles con presencia de colágena tipo I (100, 75/25 y 50/50), los cuales de igual manera comenzaron a formar agregados celulares a las 72 h de cultivo (**Figura 10B**).

De manera análoga al resultado a diferentes combinaciones de colágena tipo I/MB (véase **Figura 9B**), los hepatocitos cultivados en hidrogeles rígidos entrecruzados con los extractos de dMEC obtenidos a 2 y 48 h de digestión con pepsina cambiaron su morfología y área celular a las 72 h de cultivo, indicando que habían sufrido una transformación tipo epitelio-mesénquima mencionada ampliamente en la literatura [79] (paneles inferiores **Figura 10B**).

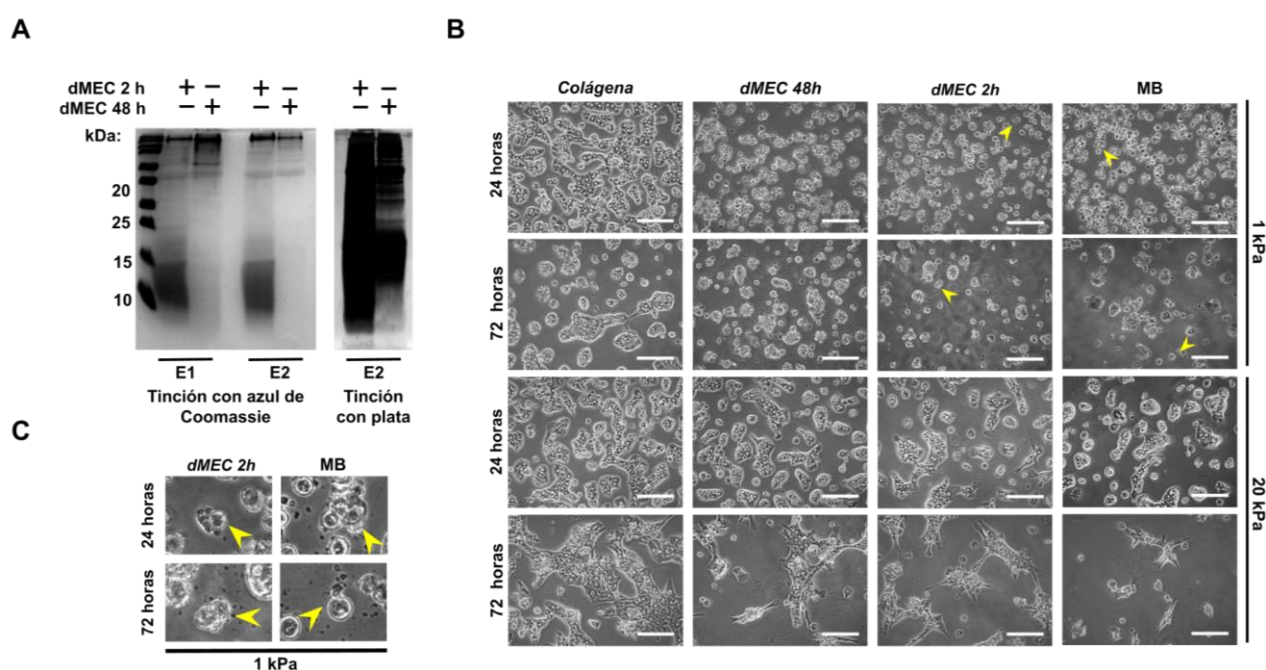


Figura 10. Los extractos de dMEC después de 48 h de digestión conjugados en hidrogeles de PAA promueven la adhesión y viabilidad en comparación con los extractos de dMEC de 2 h. (A) Caracterización de extractos dMEC a través de tinción con azul de Coomassie y tinción con plata de geles de poliacrilamida. Los extractos de dMEC a 2 y 48 h de digestión fueron separados por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). (B) Hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles de PAA de 1 kPa y 20 kPa conjugados con colágena tipo I, dMEC 48 h, dMEC 2 h y MB a las 24 y 72 h de cultivo. (C) Acercamiento de células apoptóticas a las 24 h de cultivo. Las imágenes se obtuvieron a partir de un objetivo de 20X, utilizando el microscopio invertido Eclipse Ti-S. Barra de escala: 500 μ m. Las cabezas de flechas amarillas señalan la presencia de cuerpos apoptóticos.

5.3 La colágena tipo I promueve la sobrevivencia de hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles de poliacrilamida suaves. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue capaz de rescatar la viabilidad en hepatocitos cultivados en sustratos con extractos de dMEC de 2 h.

Una vez demostrado que los hepatocitos primarios cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida suaves conservan su morfología, y que las proteínas de la MEC al parecer tienen un impacto importante en la sobrevivencia. Nuestro siguiente paso fue evaluar la sobrevivencia de los hepatocitos, específicamente en condiciones donde se observó la presencia de cuerpos apoptóticos, MB y dMEC 2 h (**Figuras 9B y 10B**). Sabemos que en la apoptosis las células presentan características morfológicas y bioquímicas particulares como la condensación de cromatina, el encogimiento celular, la formación de cuerpos apoptóticos (fragmentos celulares unidos a la membrana) y la más destacada, la fragmentación del ADN por la actividad de endonucleasas, produciendo fragmentos de ADN oligonucleosómico bicatenario [80,81]. De acuerdo con esta última característica, determinamos células que están en proceso de apoptosis mediante el ensayo TUNEL, cuyo fundamento se basa en la capacidad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal que incorpora 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP) marcado en extremos 3'-hidroxilo libres generados por la fragmentación del DNA genómico [82]. Por otro lado, es bien sabido que la incorporación de hormonas o factores de crecimiento en las formulaciones de los medios de cultivo para hepatocitos primarios favorecen la supervivencia y homeostasis de las células. Con base en el conocimiento de que los factores de crecimiento protegen a las células de la apoptosis [83,84], añadimos al medio de cultivo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración final de 20 ng/mL para determinar su efecto en la sobrevivencia de los hepatocitos primarios. Específicamente, cultivamos hepatocitos primarios sobre hidrogeles de poliacrilamida suaves entrecruzados con colágena tipo I (control), extractos de dMEC 2 h y con proteínas de la MB en ausencia y presencia de EGF. Como esperábamos, nuestros resultados demostraron que en ausencia de EGF y en hidrogeles entrecruzados con dMEC 2 h y MB, el número de hepatocitos positivos a la reacción de TÚNEL fue mayor respecto al control (**Figura 11A y B**). Tras el estímulo de EGF, se notó una disminución significativa en el número de células positivas a TUNEL en las condiciones con dMEC 2 h, pero de manera sorpresiva, no en condiciones con MB como se muestra en la gráfica de la **Figura 11B**. Cabe señalar que independientemente de la naturaleza de la MEC conjugada o la presencia del estímulo de EGF hubo un número basal de hepatocitos positivos a TÚNEL cuando fueron cultivados en hidrogeles suaves. Un caso particular es el de los hepatocitos cultivados sobre colágena tipo I. Aparentemente estos hepatocitos sobrevivieron de mejor manera (pocas células positivas al ensayo de TUNEL), inclusive en ausencia del factor de crecimiento epidérmico. La activación (por fosforilación) de las proteínas cinasas activadas por mitógenos, ERK 1 y ERK 2, se ha asociado con funciones antiapoptóticas al controlar la sobrevivencia celular, mediante la regulación positiva o negativa de proteínas antiapoptóticas o proapoptóticas, respectivamente, todo esto a

través mecanismos transcripcionales y postraduccionales [85–87]. Como se mencionaba en la sección de *Antecedentes*, en los hepatocitos se ha visto que la rigidez del sustrato regula la activación de estas proteínas, por lo que evaluamos si la rigidez del sustrato, así como la colágena tipo I participan en dicha activación. Nuestros resultados demostraron que a medida que aumentó la concentración de colágena tipo I aumentó la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 en hidrogeles de poliacrilamida suaves a las 24 h de cultivo, así como también al aumentar la rigidez de sustrato (20 kPa) (**Figura 11C**).

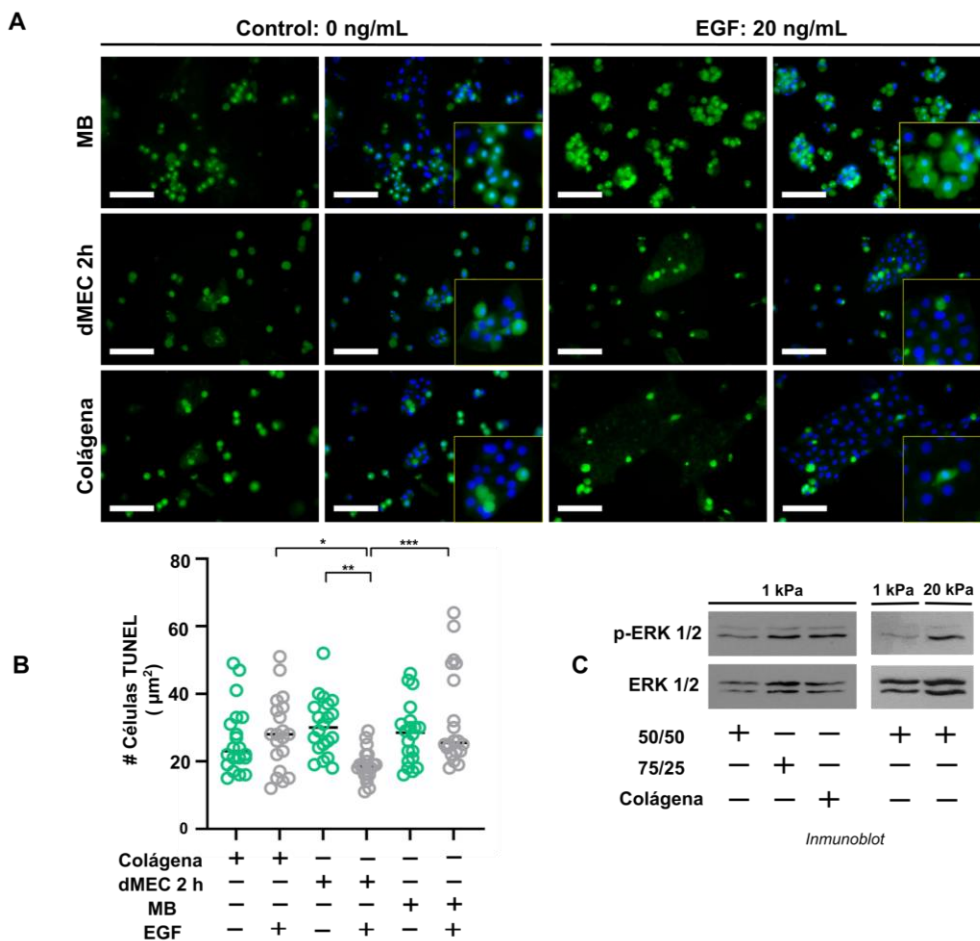


Figura 11. El factor EGF es capaz de rescatar la viabilidad de hepatocitos en sustratos suaves con extractos de dMEC 2 h, pero no en hepatocitos cultivados sobre sustratos suaves con proteínas asociadas a la MB. (A) Imágenes representativas de hepatocitos positivos a TÚNEL cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa entrecruzados con MB, dMEC 2 h y colágena tipo I a las 72 h. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio de fluorescencia Eclipse haciendo uso de un objetivo de 40X. Barra de escala: 100 µm. **(B)** Análisis cuantitativo de hepatocitos primarios positivos a TÚNEL cultivados en las condiciones ya mencionadas. Los datos son representados como la media ± la desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican significancia para $P < 0.05$. **(C)** Inmunoblot de la activación de cinasas ERK 1/2 en hidrogeles de 1 kPa.

5.4 El factor de crecimiento epidérmico promueve la agregación de hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves y en presencia de colágena tipo I, pero no su proliferación.

Una vez obtenidos los resultados de supervivencia por efecto del EGF, lo siguiente que quisimos investigar fue el efecto de este factor de crecimiento en la proliferación de hepatocitos cultivados en hidrogeles de poliacrilamida suaves entrecruzados con fracciones de colágena tipo I (100, 75/25 y 50/50). Como se mencionó previamente, en el capítulo 1, los factores de crecimiento como el EGF son capaces de estimular la síntesis de ADN en las células, favoreciendo la proliferación celular [83]. Sin embargo, contrario a esto, nuestros experimentos bajo el estímulo con EGF no exhibieron un incremento en el número de hepatocitos en ninguna de las condiciones establecidas como se muestra en las **Figuras 12A y B**. No obstante, durante el desarrollo de estos experimentos notamos que la estimulación con EGF promovía la formación de agregados celulares más grandes (**Figura 12A**), por lo que decidimos evaluar este efecto mediante un análisis cuantitativo del tamaño (área) de estos agregados. Precisamente lo que observamos fue que el tamaño de los agregados aumentó sobre todo en hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves entrecruzados con colágena después de las 72 h de cultivo y en presencia de EGF. Este mismo incremento también se observó a las 72 h en hepatocitos cultivados sobre hidrogeles entrecruzados con fracciones de colágena tipo I (75/25 y 50/50). Por otro lado, la estimulación con EGF no promovió la formación de agregados celulares de los hepatocitos cultivados en hidrogeles entrecruzados con dMEC 48 h (**Figura 12A y C**).

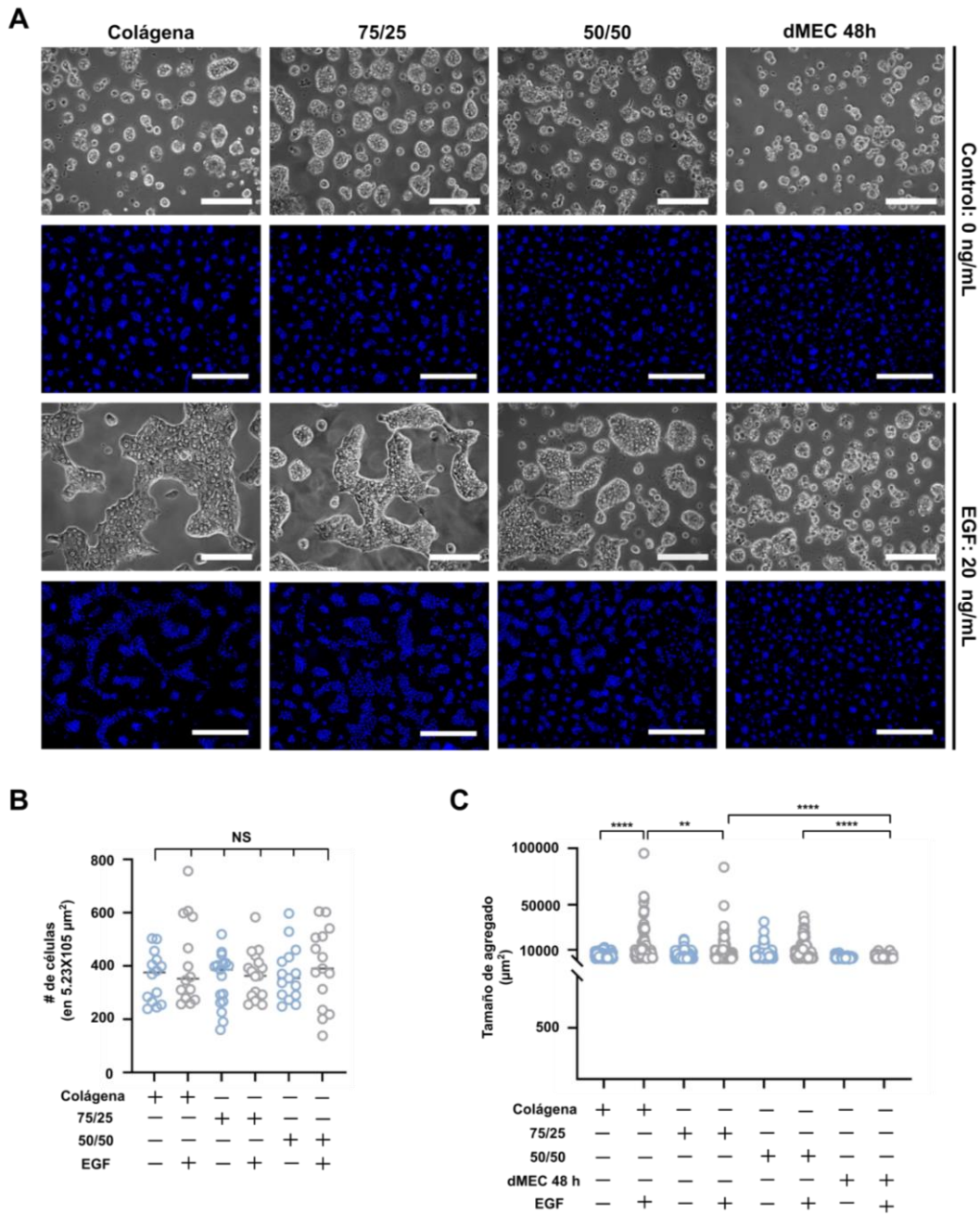


Figura 12. El EGF promueve la formación de agregados celulares de hepatocitos, pero no su proliferación. (A) Imágenes en campo claro y de fluorescencia representativas de los agregados celulares y los núcleos de los hepatocitos respectivamente en ausencia y presencia de EGF después de 72 h de cultivo. Las imágenes se obtuvieron a partir de un objetivo de 20X y 10X utilizando el microscopio invertido Eclipse Ti-S y el microscopio de fluorescencia Eclipse, respectivamente. Barra de escala: 500 μm . (B) Cuantificación del número de hepatocitos a partir de los núcleos marcados con DAPI. Los datos son representados como la media \pm la desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican significancia para $P < 0.05$. (C) Análisis cuantitativo del tamaño de agregados formados por los hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa conjugados con distintas combinaciones de colágena tipo I y MB y con extractos dMEC 48 h en ausencia y presencia de EGF después de 72 h de cultivo. Los datos son representados como la media \pm la desviación estándar (SD) de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican significancia para $P < 0.05$.

5.5 Hepatocitos primarios sembrados en hidrogeles de PAA suaves y en presencia de colágena tipo I mantienen la síntesis de glucógeno incluso en periodos largos de cultivo.

Una vez establecido que la supervivencia y la formación de agregados se mantienen en condiciones con presencia de colágena, especialmente en aquellas con fracciones altas de colágena tipo I (100 y 75/25), lo siguiente que hicimos fue determinar si en estas condiciones los hepatocitos son capaces de preservar algunas de sus funciones metabólicas más representativas. Como ya se ha mencionado, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre es una de las funciones más destacadas del hígado y esta se consigue a través la eliminación rápida de glucosa que llega al hígado a través de la vena porta después de la ingesta de alimentos (glucólisis) y mediante la producción de glucosa cuando no existe una fuente exógena (glucogenólisis y gluconeogénesis) [88]. Para que el hígado lleve a cabo la glucogenólisis existen reservas de almacenamiento de polisacáridos (glucógeno) en los hepatocitos, las cuales se forman como respuesta fisiológica ante el aumento de la concentración de glucosa en sangre después de la ingesta de alimentos [89]. El glucógeno en los hepatocitos se encuentra en forma de gránulos que son sintetizados y degradados por enzimas específicas, glucógeno sintetasa y glucógeno fosforilasa respectivamente. Para evaluar la presencia de estos depósitos de glucógeno realizamos la tinción de PAS, en la cual el ácido peryódico oxida las unidades dentro del polisacárido creando grupos aldehído que reaccionan con el reactivo de Schiff (una mezcla de pararosanilina y metabisulfito de sodio) produciendo un color magenta. Nuestros resultados mostraron una coloración magenta intensa, indicando una presencia alta de glucógeno en los hepatocitos cultivados en hidrogeles de poliácridamida suaves, en las dos condiciones evaluadas, a las 24 y 120 horas posteriores del cultivo (**Figura 13**; recuadros paneles inferiores). En contraste, los hepatocitos cultivados sobre placas de poliestireno con depósito de colágena (condición control) mostraron una coloración magenta muy tenue (**Figura 13**; recuadros paneles superiores).

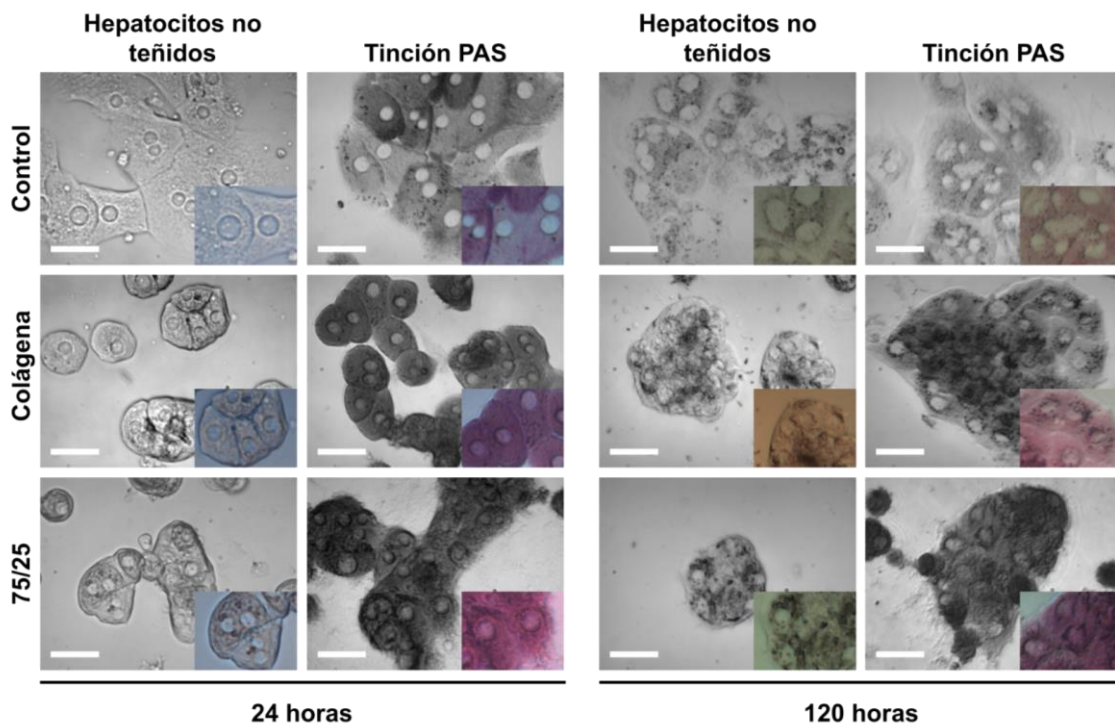


Figura 13. Los hepatocitos primarios cultivados sobre hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa conjugados con colágena tipo I preservan sus depósitos de glucógeno después de 120 h de cultivo. Tinción de PAS de hepatocitos cultivados sobre placas de poliestireno con depósito de colágena y sobre hidrogeles de poliacrilamida suaves entrecruzados con 100% colágena y 75% colágena con 25% MB a las 24 y 72 h de cultivo. La coloración magenta intensa de los recuadros de los paneles inferiores indica presencia alta de glucógeno. Las imágenes se obtuvieron a partir de un objetivo de 40X utilizando el microscopio invertido Eclipse Ti-S.

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo de tesis, mantener el fenotipo y función de hepatocitos en cultivos celulares por periodos largos de tiempo es uno de los objetivos principales de muchos laboratorios de investigación incluido el nuestro. Es bien sabido que los hepatocitos primarios cultivados en placas de poliestireno recubiertas con MEC se transdiferencian en un fenotipo de tipo mesenquimatoso después de aproximadamente 72 h de cultivo, perdiendo sus funciones típicas como secreción de albúmina, almacenamiento de glucógeno, síntesis de urea, entre otras. En ese sentido, además de evaluar la acumulación de depósitos de glucógeno (**figura 13**), nuestro laboratorio ha explorado la preservación de la secreción de albúmina en diferentes condiciones de cultivo. Nuestros resultados indican que hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles suaves de poliacrilamida, a diferencia del almacenamiento de glucógeno, pierden la expresión de albúmina a los 5 días de cultivo aun cuando los hepatocitos no muestran cambios en su arreglo del citoesqueleto de actina (datos no mostrados), sugiriendo que la pérdida de la expresión de albúmina es regulada por otras señales más allá de la pérdida de la polaridad mediada por la rigidez del sustrato [41].

5.6 Diseño de oligonucleótidos para posteriormente determinar la expresión de genes, de identidad y función hepática, en cultivo primario de hepatocitos.

Hasta aquí nuestros resultados demuestran que la colágena fibrilar tipo I participa en la supervivencia y agregación de hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles blandos. Ahora bien, para conocer qué marcadores hepáticos están expresados en estas condiciones de cultivo decidimos explorar la expresión de genes de identidad y función hepática por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR). Como se abordó en el capítulo 1, un gran número de genes funcionales se encuentran zonados, es decir su expresión es preferencial de acuerdo al ambiente que rodea a los hepatocitos (**ver Figura 3**), entre los genes funcionales que pretendemos evaluar están genes preferenciales de la región periportal (zona 1) como la glucógeno sintasa 2 (Gys2), la Acetil-CoA Acetiltransferasa 1 (ACAT1) y la arginasa 1 (ARG1); genes preferenciales de la zona media (zona 2) como la coenzima A del ácido biliar: aminoácido N-aciltransferasa (Baat); y genes preferenciales de la región pericentral (zona 3) como la glutamina sintetasa (GLUL) y la carboxilesterasa 1E (CES1E) [90]. Como gen de identidad exploramos la expresión del factor nuclear hepático 4 alfa (HNF4 α) y como control de carga pensábamos utilizar al gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (**Ver Apéndice 2**). Lamentablemente, por las condiciones de la pandemia por el virus SARS-Cov-2 ya no me fue posible evaluar la expresión de estos genes bajo las condiciones de cultivo estudiadas en mi trabajo de tesis. No obstante, muestro el diseño de estos oligonucleótidos que se utilizarán en experimentos futuros en el laboratorio (**Ver Apéndice 2**).

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Obtención y caracterización de péptidos de matriz extracelular a partir de hígado descelularizado de rata

La obtención de la MEC como un andamio funcional para la regeneración de órganos, así como para la obtención de péptidos para modelos *in vitro*, se ha convertido en una estrategia de gran relevancia para la ingeniería de tejidos. Como consecuencia, se han estudiado diversos métodos para conseguir una descelularización que permita conservar la integridad de las proteínas de la MEC del órgano. Existen diversos métodos que han demostrado tener una alta eficacia de descelularización, siendo los más destacados los métodos químicos y enzimáticos [69]. En años recientes, un grupo de investigación especializado en la descelularización de hígados porcinos demostró que el detergente iónico SDS al 1% permitía la eliminación casi completa de los componentes celulares. Adicionalmente, este mismo grupo determinó que el uso del detergente no iónico tritón X-100 al 1%, después de la perfusión con SDS, era ideal para obtener una descelularización óptima ya que elimina cualquier residuo de SDS [70,91]. No obstante, la perfusión con SDS debe trabajarse cuidadosamente, ya que este tipo de detergente es capaz de provocar daños importantes a la MEC. Para mejorar el rendimiento de obtención de péptidos de matriz extracelular y evitar daños significativos a la matriz extracelular por el detergente SDS optamos por utilizar una combinación de varios métodos de descelularización que incluyen métodos químicos (perfusión con Tritón X-100 y NH_4OH) y métodos enzimáticos (DNAsa). Se sabe que el tritón X-100 rompe las interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y en menor grado las interacciones proteína-proteína, por lo que la descelularización con este detergente propicia que las proteínas de la MEC no pierdan su conformación funcional [69,92]. No obstante, el Tritón X-100 no es capaz de eliminar por sí solo todo el material celular por lo que es necesario utilizar simultáneamente el tratamiento con NH_4OH , el cual solubiliza componentes citoplasmáticos alterando la membrana plasmática de las células y las membranas de los orgánulos que las componen [69,92]. Adicionalmente, para una mayor eficiencia de descelularización también se utilizó la enzima DNAsa en presencia de MgCl_2 con el objetivo de fragmentar el DNA bicatenario. La combinación de dichos métodos nos permitió obtener un órgano traslúcido (sin material celular)

Figura 7A.

Tal como se mencionó en la sección de resultados, utilizamos el método de digestión con pepsina para la obtención de péptidos de matriz extracelular a partir de hígados descelularizados (dMEC). La pepsina, es una endopeptidasa que precisa de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica, por lo que pertenece al grupo de las aspartil peptidasas [93]. Esta enzima exhibe escisión preferencial para residuos hidrófobos, preferiblemente aromáticos (Phe, Trp) a un $\text{pH} < 3.0$, y se ha documentado como una excelente alternativa para la digestión de proteínas debido a su reproducibilidad y facilidad de inhibir su actividad catalítica al neutralizar el pH. Al

inicio de este trabajo comenzamos a realizar pruebas con colagenasa, para la digestión de péptidos de MEC, que, a diferencia de la pepsina, es una metalopeptidasa, que precisa de cationes de metal divalente para llevar a cabo su actividad catalítica, específicamente de Zn^{2+} y Ca^{2+} [94]. Esta enzima se obtiene a partir de la bacteria *Clostridium histolyticum* y se distingue por su capacidad para digerir colágenos nativos de triple hélice de tipos I, II y III al escindir en la secuencia repetida de colágeno Gly-X-Y [36]. No obstante, mediante esta técnica, no se obtuvieron resultados concluyentes en cuanto al enriquecimiento de péptidos (datos no mostrados), por lo que requiere mayor estandarización para futuros trabajos de investigación. En contraste, la digestión con pepsina mostró diferencias en cuanto a un enriquecimiento de péptidos, reticulares y fibrilares de la dMEC a los distintos tiempos establecidos (véase resultados de la **Figura 7B**, comparados con el último carril de el control de colágena). Esto lo asociamos a que la actividad enzimática de la pepsina no se limita únicamente a proteínas fibrilares.

Algo que es muy importante destacar es que es la primera vez que se utilizan péptidos de MEC de hígado descelularizado extraídos a diferentes tiempos de digestión para su incorporación a hidrogeles de rigidez variable en cultivos de hepatocitos primarios, basado en la evidencia del grupo de investigación especializado en cardiomiocitos de la Dra. Lauren D. Black, en donde encontraron que el enriquecimiento de péptidos es diferencial de acuerdo con el tiempo de digestión de la MEC. Dicho grupo de investigación demostró que a las primeras horas de digestión (tiempo corto de 3 h) se digieren principalmente proteínas poco reticuladas, mientras que en tiempos prolongados de digestión (tiempo intermedio de 12 h; tiempo largo de 48 h) hay mayor enriquecimiento de proteínas fibrilares, siendo la colágena tipo I la más evidente [72]. De acuerdo con este estudio y a la confirmación del enriquecimiento diferencial obtenido mediante tinción con plata (**Figura 7B**) propusimos el uso de péptidos de MEC digeridos durante 2 y 48 h para ser incorporados en hidrogeles de poliacrilamida de rigidez variable.

6.2 La colágena tipo I promueve la adhesión celular y agregación, de hepatocitos de rata, a sustratos suaves de poliacrilamida. Sustratos rígidos incrementan el área celular de hepatocitos primarios cultivados.

En años recientes se ha reconocido que además de las propiedades bioquímicas, las propiedades mecánicas de los tejidos biológicos son fundamentales para las distintas respuestas celulares [37,95]. La MEC es una estructura dinámica que proporciona un andamio de apoyo que regula activamente las funciones biológicas de las células a través de su composición proteica [78]. De modo que el enriquecimiento diferencial de proteínas de la MEC regula la rigidez del órgano y por consiguiente la función de las células que lo integran. Durante la fibrosis hepática se producen una gran cantidad de componentes de MEC, entre los que destacan las proteínas fibrilares colágena tipo I y tipo III [96,97]. Estas condiciones promueven la desdiferenciación de los hepatocitos al impulsar cambios en su citoesqueleto [98]. Nuestros resultados

mostraron un aumento significativo en el área celular de los hepatocitos sembrados sobre hidrogeles rígidos a las 72 h de cultivo (**Figura 8**). Experimentos *in vitro* han reportado que una mayor tensión citoesquelética se caracteriza por un aumento en el área celular [37]. Se ha demostrado que este aumento en el área celular está asociado con la regulación del aparato de actomiosina a través de la vía Rho/ROCK, causando la desdiferenciación de los hepatocitos y por lo tanto la pérdida de su función, ya que al inhibir esta vía, aún en condiciones de alta rigidez, fue posible preservar la expresión del marcador de identidad hepático, HNF4 α [37]. Trabajos a futuro podrían considerar inhibir esta vía de señalización en hidrogeles con rigidez desde 1 kPa o menores y evaluar si el fenotipo y función de hepatocitos cultivados se mantiene en periodos largos de tiempo.

Para promover la señalización bioquímica de los hepatocitos, incorporamos diversas proteínas de MEC a diferentes combinaciones sobre hidrogeles de poli(acrilamida). En estudios previos se han evaluado proteínas de matriz extracelular de manera individual, sin embargo ninguna es capaz de preservar el mantenimiento de todas o de la mayoría de las funciones atribuidas a los hepatocitos [77], asimismo también se ha evaluado el Matrigel® con resultados favorables. Cabe destacar que todos estos estudios se han realizado en condiciones rígidas, sin considerar el grado de la rigidez y otras propiedades relevantes de la MEC. Por lo que se cree que tanto la combinación de varios tipos de proteínas de matriz extracelular como el uso de sustratos capaces de imitar la MEC, como los hidrogeles, es la mejor estrategia para preservar la función celular normal. Nuestros resultados mostraron que en todas las combinaciones de colágena tipo I y péptidos de membrana basal, los hepatocitos pudieron adherirse, siendo más favorecida esta adhesión en la presencia de colágena tipo I (**Figura 9B**). La adhesión de los hepatocitos a la MEC es muy importante para la regulación de diferentes procesos biológicos como la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia celular; dichos procesos son llevados a cabo mediante receptores de adhesión transmembranal, que unen a la MEC al citoesqueleto de actina, permitiendo así que las propiedades bioquímicas y mecánicas de la MEC influyan en las cascadas de transducción de señales [99,100]. Se sabe que la adhesión a la colágena tipo I monomérica a diferencia de la fibrilar promueve la sobrevivencia y el aumento de la función celular [101], es probable que por esto en los hidrogeles entrecruzados con colágena no se presentaron cuerpos apoptóticos en comparación con los hepatocitos sembrados sobre péptidos de la membrana basal, MB (**Figura 9B**), lo que sugiere que la colágena regula de manera positiva la sobrevivencia de los hepatocitos. Creemos que dicha regulación está mediada por los receptores del dominio de discoidina (DDR), los cuales son receptores de tirosina quinasas (RTKs), cuyos ligandos son las colágenas. Estos receptores a diferencia de otros RTKs se caracterizan por experimentar autofosforilación con una cinética muy lenta y sostenida después de la unión de su ligando [102]. No obstante, al igual que otros RTKs, controlan procesos celulares críticos, como es el caso de la sobrevivencia celular [103,104].

Otro punto importante a destacar es la formación de agregados celulares en sustratos suaves, que se asocia al mantenimiento de la polaridad de los hepatocitos y por consiguiente a la conservación de la función celular. Según parece, nuestro laboratorio es el primero en reportar el mantenimiento de la polaridad de los hepatocitos cultivados en este tipo de sustratos poliméricos, en donde se observó que el entrecruzamiento con colágena tipo I parece ser clave para la formación de estos agregados y así formar estructuras similares a canalículos. Creemos que la formación de dichas estructuras se debe al efecto inhibitorio de la tensión nuclear de los hepatocitos primarios que parecen tener los sustratos suaves, demostrado por no haber aumento en el área celular y por la ausencia de fibras de estrés a las 72 h de cultivo.

En relación con el estudio del grupo de la Dra. Lauren D. Black, donde se evaluó y caracterizó a diferentes péptidos de matriz extracelular a diferentes tiempos de digestión [72], encontramos que los hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves entrecruzados con los extractos de dMEC a 48 h de digestión con pepsina mostraron similitudes de adhesión con los cultivados en colágena, confirmando un enriquecimiento de proteínas fibrilares en dichos extractos. En caso contrario, los hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves entrecruzados con los extractos de dMEC a 2 h de digestión con pepsina mostraron similitudes de adhesión y su supervivencia se vio comprometida (formación de cuerpos apoptóticos) como aquellos hepatocitos cultivados sobre péptidos de MB, sugiriendo un enriquecimiento de proteínas asociadas a la MB en dichos extractos (**Figura 10**).

En conjunto estos resultados sugirieron que la presencia de colágenas fibrilares en condiciones suaves es esencial para promover la adhesión, supervivencia y formación de agregados de hepatocitos primarios.

6.3 La colágena tipo I promueve la supervivencia de hepatocitos primarios cultivados en hidrogeles de poliacrilamida suaves. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue capaz de rescatar la viabilidad en hepatocitos cultivados en sustratos con extractos de dMEC 2 h.

Nuestros resultados demostraron que la apoptosis (evaluada por el ensayo de TUNEL) fue notablemente aumentada en aquellas condiciones donde estuvo ausente la colágena tipo I (**Figura 11**). Como previamente se discutió en el apartado 6.2, las células poseen receptores DDR, que unen colágena. La unión receptor ligando provoca la autofosforilación de los DDR de manera lenta y sostenida. Esto activa varias vías de señalización intracelulares, entre las que se encuentran aquellas que median la supervivencia celular, PI3K/AKT y ERK 1/2 [104,105]. Nuestros resultados confirmaron la participación de la colágena en la supervivencia a través de la evaluación de la cinasa ERK 1/2 (**Figura 11C**), en donde efectivamente las concentraciones crecientes de colágena promovieron la fosforilación de ERK 1/2, lo

cual tiene una relación directa con la rigidez del sustrato como se mencionaba en el apartado 5.3 en la sección de resultados.

Ante la poca sobrevivencia de los hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves con péptidos de MB y dMEC 2 h, quisimos evaluar si el factor de crecimiento epidérmico (EGF) era capaz de rescatar la viabilidad celular de los hepatocitos en esas condiciones. Fue totalmente inesperado que el EGF sólo rescató a aquellos hepatocitos cultivados sobre hidrogeles suaves entrecruzados con dMEC 2 h y no así también a los hepatocitos cultivados sobre péptidos de MB. Esto puede atribuirse a que los péptidos de matriz extracelular obtenidos después de dos horas de digestión con pepsina (dMEC 2 h) pudieran tener trazas de algún tipo de proteínas fibrilares que ayudarán a favorecer su sobrevivencia después del estímulo con EGF. Es probable que la adición de otros compuestos como el factor de crecimiento hepático (HGF, del inglés hepatic growth factor), el cual ha sido reportado ser clave en procesos de regeneración hepática, así como la activación de señales anti-inflamatorias y anti-apoptóticas, favorezca el rescate de los hepatocitos cultivados sobre péptidos de MB.

6.4 El factor de crecimiento epidérmico (EGF) promueve la agregación de hepatocitos cultivados en hidrogeles suaves y en presencia de colágena tipo I, pero no su proliferación

Se ha reportado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) interviene en la regulación de la proliferación en cultivos de hepatocitos primarios. El EGF es un agente mitógeno, proteína que induce la mitosis celular, secretado por las glándulas de Brunner y que llega al hígado por medio de la circulación portal. Ante situaciones de daño hepático, dicho factor se excreta en grandes cantidades contribuyendo a la regeneración del hígado [106]. Por dichas cualidades, el EGF es ampliamente utilizado para promover la proliferación en cultivos *in vitro* de hepatocitos primarios, ya sea solo o en combinación con otros factores que potencien su actividad. Con base en la información anterior y contrario a lo que esperábamos, no se observó un aumento en la proliferación celular de los hepatocitos bajo el solo estímulo con EGF, en un periodo de 3 días (**Figura 12A y 12B**). Esto podría asociarse al poco tiempo de estimulación con este factor de crecimiento, ya que en condiciones *in vitro* se ha informado que el pico de síntesis de DNA de los hepatocitos en condiciones basales se da aproximadamente a las 36 h.

La mayoría de los estudios para promover la proliferación celular de hepatocitos primarios en donde se utiliza el EGF lo hacen en combinación con otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α). La elección de EGF, HGF y TGF- α es debido a que son potentes mitógenos de hepatocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, además de estar implicados en la regulación de la regeneración hepática [107]. Se sabe que los hepatocitos primarios aislados por perfusión con colagenasa se encuentran en fase

G1 tardía y sólo son capaces de progresar más allá del punto de restricción por la estimulación con factores de crecimiento, que son capaces de activar proteínas cinasas dependientes de ciclina (CDKs) mediante la inducción de ciclina D [108,109]. Por lo que para lograr la adecuada proliferación de hepatocitos *in vitro* en estudios posteriores será necesaria la estimulación con diversos factores de crecimiento en combinación con otras moléculas asociadas a la desdiferenciación y crecimiento celular. En el **Apéndice 1** de esta tesis muestro diferentes hormonas y factores de crecimiento presentes en diversas formulaciones de medios de cultivo para el mantenimiento de cultivo primario de hepatocitos; información valiosa que en futuras investigaciones de nuestro laboratorio será importante considerar.

No obstante, nuestros resultados mostraron que el EGF sí promueve la formación de agregados celulares (**Figura 12A y 12C**), semejando a los cordones hepáticos encontrados en condiciones fisiológicas. Como se mencionó en los antecedentes, la disposición normal de los hepatocitos es en forma de placas de una o dos células de grosor a lo largo del sinusoides hepático, lo cual está relacionado directamente con la polaridad de los hepatocitos, que como ya se mencionaba regula la función hepática. Aunado a esto, se ha demostrado que en cultivos *in vitro* tridimensionales (3D) la agregación celular similar al tejido hepático previene la desdiferenciación de los hepatocitos a través de la expresión regulada al alza de HNF4 α y de la supresión de la expresión de marcadores de tipo mesenquimal, como Vimentina y Snail1 [110]. En el caso de cultivos *in vitro* bidimensionales 2D como el que se presenta en esta tesis, nuestro grupo de investigación es el primero en reportar la formación de cordones hepáticos en sustratos suaves entrecruzados con proteínas de MEC ante la estimulación con EGF, los cuales suponemos que también se encuentran regulando dichos procesos de expresión.

6.5 Hepatocitos primarios sembrados en hidrogeles de poliacrilamida suaves y en presencia de colágena tipo I mantienen la síntesis de glucógeno incluso en periodos largos de cultivo.

Como se mencionó en el capítulo de resultados, la detección de depósitos de glucógeno en los hepatocitos es una estrategia para evaluar si las células son capaces de mantener la homeostasis de la glucosa a través de la síntesis de glucógeno. El glucógeno es un polímero ramificado de residuos de glucosa que sirve como un medio osmóticamente neutro para almacenar glucosa en las células, y que se puede descomponer para producir moléculas de glucosa cuando se necesita energía [111]. La enzima responsable de la síntesis de glucógeno es la glucógeno sintasa (GS), codificada por Gys2 en el hígado, que cataliza la formación de enlaces α -1,4-glicosídicos con UDP-glucosa como donador de glucosilo [111].

Nuestros resultados mostraron que en los hepatocitos sembrados en hidrogeles suaves y con entrecruzamiento de colágena tipo I, la tinción de los depósitos de glucógeno se intensificaba en comparación con la tinción en condiciones rígidas con

depósito de colágena. Esto indica que, en condiciones suaves, hidrogeles de poliacrilamida de 1 kPa, hay mayor expresión del gen Gys2 que codifica para la GS y en consecuencia mayor almacenamiento de glucógeno. Estos resultados también señalan una preservación de la función celular normal de los hepatocitos. Sin embargo, para complementar mejor estos hallazgos es necesario realizar un análisis de la expresión del gen Gys2 mediante PCR a las condiciones de cultivo antes mencionadas. Cabe señalar que se ha reportado que la suplementación del medio de cultivo con factores como la oncostatina M (OSM) y dexametasona (DEX) mejoran el almacenamiento de glucógeno [63] en cultivos de hepatocitos primarios (**ver Apéndice 1**), por lo que valdría la pena evaluar la suplementación del cultivo con dichos compuestos para ver si se presentan diferencias en dicho almacenamiento de glucógeno u otra actividad propia de los hepatocitos como la activación de citocromos P450.

Cabe resaltar aquí, que aun cuando diversas funciones de los hepatocitos, como el almacenamiento de glucógeno, se mantuvieron por períodos largos de tiempo (120 h) otras no fueron preservadas. Como se mencionaba al final de la sección anterior la polaridad de los hepatocitos (presencia de estructuras tipo canalículo) fue preservada durante 5 días de cultivo en sustratos suaves; de igual manera, aunque en menor proporción el arreglo del citoesqueleto próximo a estas estructuras también fue mantenido, mientras que la expresión de albúmina, en este periodo de tiempo, no fue preservada (datos no mostrados) sugiriendo que la pérdida de expresión de albúmina está regulada por señales adicionales a las que modulan su polaridad y arreglo del citoesqueleto.

Diversos grupos de investigación han demostrado la importancia que tienen el citoesqueleto de actina y el aparato de actomiosina en la preservación de la función de hepatocitos cultivados, destacando el de Pingxin Sun y colaboradores en 2019, quienes demostraron que la tensión mecánica juega un papel fundamental en la desdiferenciación de hepatocitos desencadenada por la activación de YAP. Ellos encontraron que al disminuir la tensión mecánica, al confinar el esparcimiento celular, la desdiferenciación de los hepatocitos era inhibida al igual que con el uso de un cóctel de compuestos químicos (LBDXL: latrunculina B, blebistatina, dasatiniba, XAV939 y LY294002) capaz de bloquear la dinámica del citoesqueleto de actina y del aparato de actomiosina [112], permitiendo así la preservación y función de hepatocitos cultivados hasta por tres semanas. Sin embargo, este tipo de estrategias no han sido probadas en el contexto de proteínas de matriz extracelular y rigidez de sustrato, por lo que estas metodologías, combinadas con nuestros resultados, podrían ser fundamentales para nuestro objetivo de crear un microambiente biomimético adecuado para la preservación del fenotipo y función de hepatocitos primarios cultivados por periodos largos de tiempo, ya que hasta este momento nuestros resultados señalan que se requiere aún más la disminución de la activación de LA FORMACIÓN? DEI citoesqueleto de actina para prevenir la desdiferenciación de los hepatocitos.

6.6 Diseño de oligonucleótidos para posteriormente determinar la expresión de genes, de identidad y función hepática, en cultivo primario de hepatocitos.

Por último, diseñamos diferentes oligonucleótidos que nos permitirían analizar la expresión de diversos genes de identidad y función hepática en las condiciones experimentales presentadas en este trabajo de tesis. Diversos estudios muestran que la rigidez del sustrato es un factor clave en la expresión de genes en los hepatocitos [37,113], por lo que las condiciones de cultivo aquí examinadas y la composición del medio de cultivo también podrían ser relevantes en la expresión génica normal del hígado.

El factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4 α) es un receptor nuclear que se encuentra altamente expresado en el hígado, y regula muchos genes específicos de los hepatocitos, como los implicados en la glucólisis, la gluconeogénesis, la ureogénesis, el metabolismo de los ácidos grasos, la síntesis de ácidos biliares, la biotransformación de xenobióticos, la síntesis de apolipoproteínas y la coagulación sanguínea [114]. Reportes previos han demostrado que la expresión de HNF4 α y por consiguiente la de sus genes blanco, Gys2, Baat y F7, cambian en función de la rigidez del sustrato [37]. Por lo que nos hubiera gustado evaluar el impacto de las proteínas de MEC y el impacto del medio de cultivo en la expresión de dichos genes.

Adicionalmente pretendíamos evaluar otros genes que consideramos relevantes para el mantenimiento de la función hepática normal (**ver Apéndice 2**), bajo las condiciones probadas en esta tesis: rigidez, proteínas de MEC y factores de crecimiento.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN

Con base en el análisis de resultados concluimos que: *el uso de hidrogeles de poliacrilamida suaves (1 kPa) conjugados con fracciones de la proteína fibrilar, colágena tipo I y en combinación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) favorecieron la adhesión, la sobrevivencia y la agregación de hepatocitos primarios cultivados; además de mantener alguna de sus funciones fisiológicas como la síntesis de glucógeno por periodos prolongados de tiempo. Esto pone de manifiesto que factores como la rigidez y composición de la matriz extracelular influyen de manera importante en el comportamiento celular.*

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America*, 90(4), 643–653.
2. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology: CB*, 27(21), R1147–R1151.
3. Fox, Ira S. (2014). *Fisiología humana* (13a. ed.). McGraw Hill México.
4. MacParland, S. A., Liu, J. C., Ma, X. Z., Innes, B. T., Bartczak, A. M., Gage, B. K., Manuel, J., Khuu, N., Echeverri, J., Linares, I., Gupta, R., Cheng, M. L., Liu, L. Y., Camat, D., Chung, S. W., Seliga, R. K., Shao, Z., Lee, E., Ogawa, S., Ogawa, M., ... McGilvray, I. D. (2018). Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nature communications*, 9(1), 4383.
5. Ficht, X., & Iannacone, M. (2020). Immune surveillance of the liver by T cells. *Science immunology*, 5(51), eaba2351.
6. Colnot S., Perret C. (2011) Liver Zonation. In: Monga S. (eds) *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Molecular Pathology Library, vol 5. Springer, Boston, MA
7. Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2018). New zoning laws enforced by glucagon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), 4308–4310.
8. Kietzmann T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox biology*, 11, 622–630.
9. Manco, R., & Itzkovitz, S. (2021). Liver zonation. *Journal of hepatology*, 74(2), 466–468
10. Website. (n.d.). Premkumar K. The liver - Structure and Function of Digestive System. [cited 25 Jan 2021]. Available: http://www.brainkart.com/article/The-liver---Structure-and-Function-of-Digestive-System_21146/
11. Halpern, K. B., Shenhav, R., Matcovitch-Natan, O., Toth, B., Lemze, D., Golan, M., Massasa, E. E., Baydatch, S., Landen, S., Moor, A. E., Brandis, A., Giladi, A., Avihail, A. S., David, E., Amit, I., & Itzkovitz, S. (2017). Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature*, 542(7641), 352–356.
12. Charlton M. R. (1996). Protein metabolism and liver disease. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*, 10(4), 617–635.
13. Guo R, Xu X, Lu Y, Xie X. (2017). Physiological oxygen tension reduces hepatocyte dedifferentiation in in vitro culture. *Scientific Reports*, 7(1), 5923.
14. Brodt P. (2011). *Liver Metastasis: Biology and Clinical Management*. Springer Science & Business Media.
15. Shirakami, Y., Lee, S. A., Clugston, R. D., & Blaner, W. S. (2012). Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et biophysica acta*, 1821(1), 124–136.
16. Zhou, Z., Xu, M. J., & Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 301–315.
17. Thorgersen, E. B., Barratt-Due, A., Haugaa, H., Harboe, M., Pischke, S. E., Nilsson, P.

- H., & Mollnes, T. E. (2019). The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 70(2), 725–736.
18. Rui L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197.
 19. Barrett, E. K. (2013) Ganong Fisiología Médica. (24a. ed.). McGraw Hill Mexico.
 20. Benedetti, M. S., Whomsley, R., Poggesi, I., Cawello, W., Mathy, F. X., Delporte, M. L., Papeleu, P., & Watelet, J. B. (2009). Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug metabolism reviews*, 41(3), 344–390.
 21. Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in liver disease*, 21(1), 1–20.
 22. Liu X, Wang H, Liang X, Roberts MS. (2017). Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. *Liver Pathophysiology* (pp. 391–400).
 23. Chen, J., Jiang, S., Wang, J., Renukuntla, J., Sirimulla, S., & Chen, J. (2019). A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, 51(2), 178–195.
 24. Faber, M. S., Jetter, A., & Fuhr, U. (2005). Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97(3), 125–134.
 25. Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 58(5-6), 737–747.
 26. Treyer, A., & Müsch, A. (2013). Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 243–287.
 27. Zeigerer, A., Wuttke, A., Marsico, G., Seifert, S., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2017). Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Experimental cell research*, 350(1), 242–252.
 28. Choi, H. J., & Choi, D. (2013). Successful mouse hepatocyte culture with sandwich collagen gel formation. *Journal of the Korean Surgical Society*, 84(4), 202–208
 29. Keemink, J., Oorts, M., & Annaert, P. (2015). Primary Hepatocytes in Sandwich Culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1250, 175–188
 30. Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., López-Iglesias, C., Dekkers, F., Basak, O., van Es, J., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Begthel, H., Korving, J., van den Born, M., Zou, C., Quirk, C., Chiriboga, L., Rice, C. M., Ma, S., Rios, A., Peters, P. J., de Jong, Y. P., & Clevers, H. (2018). Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell*, 175(6), 1591–1606.
 31. Sakabe, K., Takebe, T., & Asai, A. (2020). Organoid Medicine in Hepatology. *Clinical liver disease*, 15(1), 3–8.
 32. Moradi, E., Jalili-Firoozinezhad, S., & Solati-Hashjin, M. (2020). Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue. *Acta biomaterialia*, 116, 67–83.

33. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science: AMS*, 14(4), 910–919.
34. Soldatow, V. Y., Lecluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). *In vitro* models for liver toxicity testing. *Toxicology research*, 2(1), 23–39.
35. Lee, S. M., Schelcher, C., Demmel, M., Hauner, M., & Thasler, W. E. (2013). Isolation of human hepatocytes by a two-step collagenase perfusion procedure. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (79), 50615.
36. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Fred Woessner, J. (2012). Clostridium Collagenases. Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*, 607–611.
37. Desai, S. S., Tung, J. C., Zhou, V. X., Grenert, J. P., Malato, Y., Rezvani, M., Español-Suñer, R., Willenbring, H., Weaver, V. M., & Chang, T. T. (2016). Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(1), 261–275
38. Wells R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(4), 1394–1400.
39. Yu, H., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2011). Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends in cell biology*, 21(1), 47–56.
40. Cozzolino, A. M., Noce, V., Battistelli, C., Marchetti, A., Grassi, G., Cicchini, C., Tripodi, M., & Amicone, L. (2016). Modulating the Substrate Stiffness to Manipulate Differentiation of Resident Liver Stem Cells and to Improve the Differentiation State of Hepatocytes. *Stem cells international*, 2016, 5481493.
41. Serna-Márquez, N., Rodríguez-Hernández, A., Ayala-Reyes, M., Martínez-Hernández, L. O., Peña-Rico, M. Á., Carretero-Ortega, J., Hautefeuille, M., & Vázquez-Victorio, G. (2020). Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 5(2), 30.
42. Díaz-Bello, B., Monroy-Romero, A. X., Pérez-Calixto, D., Zamarrón-Hernández, D., Serna-Marquez, N., Vázquez-Victorio, G., & Hautefeuille, M. (2019). Method for the Direct Fabrication of Polyacrylamide Hydrogels with Controlled Stiffness in Polystyrene Multiwell Plates for Mechanobiology Assays. *ACS biomaterials science & engineering*, 5(9), 4219–4227.
43. Lu, L., Li, Y., Kim, S. M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., Wang, Y., Halder, G., Finegold, M. J., Lee, J. S., & Johnson, R. L. (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4), 1437–1442.
44. Patel, S. H., Camargo, F. D., & Yimlamai, D. (2017). Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 152(3), 533–545
45. Nguyen-Lefebvre AT, Selzner N, Wrana JL, Bhat M. (2021). The hippo pathway: A master regulator of liver metabolism, regeneration, and disease. In *The FASEB Journal*, 35(5).
46. Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., Tuschl, G., Mueller, S. O., & Dooley, S. (2009). Extracellular matrix modulates sensitivity of

- hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(6), 2031–2043.
47. Zeisberg, M., Kramer, K., Sindhi, N., Sarkar, P., Upton, M., & Kalluri, R. (2006). De-differentiation of primary human hepatocytes depends on the composition of specialized liver basement membrane. *Molecular and cellular biochemistry*, 283(1-2), 181–189.
 48. Wang, Y., Kim, M. H., Shirahama, H., Lee, J. H., Ng, S. S., Glenn, J. S., & Cho, N. J. (2016). ECM proteins in a microporous scaffold influence hepatocyte morphology, function, and gene expression. *Scientific reports*, 6, 37427.
 49. Bual, R. P., & Ijima, H. (2019). Intact extracellular matrix component promotes maintenance of liver-specific functions and larger aggregates formation of primary rat hepatocytes. *Regenerative therapy*, 11, 258–268.
 50. Ye, S., Boeter, J., Penning, L. C., Spee, B., & Schneeberger, K. (2019). Hydrogels for Liver Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 6(3), 59.
 51. Arriazu, E., Ruiz de Galarreta, M., Cubero, F. J., Varela-Rey, M., Pérez de Obanos, M. P., Leung, T. M., Lopategi, A., Benedicto, A., Abraham-Enachescu, I., & Nieto, N. (2014). Extracellular matrix and liver disease. *Antioxidants & redox signaling*, 21(7), 1078–1097.
 52. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin. (2016).
 53. Website. [cited 25 May 2021]. Available: APA National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 10233, Reticulin. Retrieved May 25, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Reticulin>.
 54. Lefkowitz J. H. (2006). Special stains in diagnostic liver pathology. *Seminars in diagnostic pathology*, 23(3-4), 190–198.
 55. Bale, S. S., Geerts, S., Jindal, R., & Yarmush, M. L. (2016). Isolation and co-culture of rat parenchymal and non-parenchymal liver cells to evaluate cellular interactions and response. *Scientific reports*, 6, 25329.
 56. Ehrlich, A., Duche, D., Ouedraogo, G., & Nahmias, Y. (2019). Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices. *Annual review of biomedical engineering*, 21, 219–239.
 57. Nelson, L. J., Treskes, P., Howie, A. F., Walker, S. W., Hayes, P. C., & Plevris, J. N. (2013). Profiling the impact of medium formulation on morphology and functionality of primary hepatocytes in vitro. *Scientific reports*, 3, 2735.
 58. Dong, J., Mandenius, C.-F., Lübberstedt, M., Urbaniak, T., Nüssler, A. K. N., Knobeloch, D., Gerlach, J. C., & Zeilinger, K. (2008). Evaluation and optimization of hepatocyte culture media factors by design of experiments (DoE) methodology. In *Cytotechnology*, 57(3), 251-261.
 59. Yamaoka, M., Hirata, K., Ogata, I., Tomiya, T., Nagoshi, S., Mochida, S., & Fujiwara, K. (1998). Enhancement of albumin production by hepatocyte growth factor in rat hepatocytes: distinction in mode of action from stimulation of DNA synthesis. *Liver*, 18(1), 52–59.
 60. Dich, J., Vind, C., & Grunnet, N. (1988). Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 8(1), 39–45.

61. Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., & Miyajima, A. (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *The EMBO journal*, *18*(8), 2127–2136.
62. Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., & Ishige, N. (2017). Oncostatin M in William's E medium is suitable for initiation of hepatocyte differentiation in human induced pluripotent stem cells. *Molecular medicine reports*, *15*(5), 3088–3092.
63. Kamiya, A., Kinoshita, T., & Miyajima, A. (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS letters*, *492*(1-2), 90–94.
64. Richman, R. A., Claus, T. H., Pilkis, S. J., & Friedman, D. L. (1976). Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(10), 3589–3593.
65. Oh, H.-Y., Namkoong, S., Lee, S.-J., Por, E., Kim, C.-K., Billiar, T. R., Han, J.-A., Ha, K.-S., Chung, H.-T., Kwon, Y.-G., Lee, H., & Kim, Y.-M. (2006). Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death and Differentiation*, *13*(3), 512–523.
66. Berry, M. N., & Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology*, *43*(3), 506–520.
67. Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current protocols in cell biology*, Chapter 10.
68. Lee, J. Y., Dominguez, A. A., Nam, S., Stowers, R. S., Qi, L. S., & Chaudhuri, O. (2019). Identification of cell context-dependent YAP-associated proteins reveals β_1 and β_4 integrin mediate YAP translocation independently of cell spreading. *Scientific reports*, *9*(1), 17188.
69. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*(19), 3675–3683.
70. Wang, Y., Bao, J., Wu, Q., Zhou, Y., Li, Y., Wu, X., Shi, Y., Li, L., & Bu, H. (2015). Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation*, *22*(1), 48–61.
71. Lee, J. S., Shin, J., Park, H. M., Kim, Y. G., Kim, B. G., Oh, J. W., & Cho, S. W. (2014). Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. *Biomacromolecules*, *15*(1), 206–218.
72. Williams, C., Sullivan, K., & Black, L. D., 3rd (2015). Partially Digested Adult Cardiac Extracellular Matrix Promotes Cardiomyocyte Proliferation In Vitro. *Advanced healthcare materials*, *4*(10), 1545–1554.
73. Iannarone, V. J., Cruz, G. E., Hilliard, B. A., & Barbe, M. F. (2019). The answer depends on the question: Optimal conditions for western blot characterization of muscle collagen type 1 depends on desired isoform. *Journal of biological methods*, *6*(3), e117.
74. Tee, S. Y., Bausch, A. R., & Janmey, P. A. (2009). The mechanical cell. *Current biology*:

CB, 19(17), R745–R748.

75. Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods*, 13(5), 405–414.
76. Yuasa, C., Tomita, Y., Shono, M., Ishimura, K., & Ichihara, A. (1993). Importance of cell aggregation for expression of liver functions and regeneration demonstrated with primary cultured hepatocytes. *Journal of cellular physiology*, 156(3), 522–530.
77. Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J., & Roll, F. J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *The Journal of clinical investigation*, 79(3), 801–812.
78. Klaas, M., Kangur, T., Viil, J., Mäemets-Allas, K., Minajeva, A., Vadi, K., Antsov, M., Lapidus, N., Järvekülg, M., & Jaks, V. (2016). The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific reports*, 6, 27398.
79. Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(6), 2007–2013.
80. Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 887, 41–47.
81. Iglesias-Guimaraes, V., Gil-Guiñón, E., Gabernet, G., García-Belinchón, M., Sánchez-Osuna, M., Casanelles, E., Comella, J. X., & Yuste, V. J. (2012). Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease. *The Journal of biological chemistry*, 287(10), 7766–7779.
82. Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*, 119(3), 493–501.
83. Kan, P., Miyoshi, H., & Ohshima, N. (2004). Perfusion of medium with supplemented growth factors changes metabolic activities and cell morphology of hepatocyte-nonparenchymal cell coculture. *Tissue engineering*, 10(9-10), 1297–1307.
84. Moriuchi, A., Hirono, S., Ido, A., Ochiai, T., Nakama, T., Uto, H., Hori, T., Hayashi, K., & Tsubouchi, H. (2001). Additive and Inhibitory Effects of Simultaneous Treatment with Growth Factors on DNA Synthesis through MAPK Pathway and G1 Cyclins in Rat Hepatocytes. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(1), 368–373.
85. Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(9), 726–735.
86. Yue, J., & López, J. M. (2020). Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2346.
87. Lu, Z., & Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*, 58(11), 621–631.
88. Agius L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical journal*, 414(1), 1–18.
89. Ferrer, J. C., Favre, C., Gomis, R. R., Fernández-Novell, J. M., García-Rocha, M., de la

- Iglesia, N., Cid, E., & Guinovart, J. J. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS letters*, 546(1), 127–132.
90. Ben-Moshe, S., Shapira, Y., Moor, A. E., Manco, R., Veg, T., Bahar Halpern, K., & Itzkovitz, S. (2019). Spatial sorting enables comprehensive characterization of liver zonation. *Nature metabolism*, 1(9), 899–911.
 91. Wu, Q., Bao, J., Zhou, Y. J., Wang, Y. J., Du, Z. G., Shi, Y. J., Li, L., & Bu, H. (2015). Optimizing perfusion-decellularization methods of porcine livers for clinical-scale whole-organ bioengineering. *BioMed research international*, 2015, 785474.
 92. Luo, Z., Bian, Y., Su, W., Shi, L., Li, S., Song, Y., Zheng, G., Xie, A., & Xue, J. (2019). Comparison of various reagents for preparing a decellularized porcine cartilage scaffold. *American journal of translational research*, 11(3), 1417–1427.
 93. Sepulveda, P., Marciniszyn, J., Jr, Liu, D., & Tang, J. (1975). Primary structure of porcine pepsin. III. Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A, and the complete structure of porcine pepsin. *The Journal of biological chemistry*, 250(13), 5082–5088.
 94. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Fred Woessner, J. (2012). Metallopeptidases and Their Clans. Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*, 325–370.
 95. Guimarães, C. F., Gasperini, L., Marques, A. P., & Reis, R. L. (2020). The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. In *Nature Reviews Materials*, 5(5), 351-370.
 96. Cui, X., Zhang, X., Yin, Q., Meng, A., Su, S., Jing, X., Li, H., Guan, X., Li, X., Liu, S., & Cheng, M. (2014). F-actin cytoskeleton reorganization is associated with hepatic stellate cell activation. *Molecular medicine reports*, 9(5), 1641–1647.
 97. Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 115(2), 209–218.
 98. Yee H. F., Jr (1998). Rho directs activation-associated changes in rat hepatic stellate cell morphology via regulation of the actin cytoskeleton. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(3), 843–850.
 99. Aplin, A. E., Howe, A. K., & Juliano, R. L. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current opinion in cell biology*, 11(6), 737–744. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00045-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00045-9)
 100. Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), 1028–1032.
 101. Ben-Ze'ev, A., Robinson, G. S., Bucher, N. L., & Farmer, S. R. (1988). Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), 2161–2165.
 102. Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T. E., Davis, S., Goldfarb, M. P., Glass, D. J., Lemke, G., & Yancopoulos, G. D. (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular cell*, 1(1), 25–34.
 103. Fu, H. L., Valiathan, R. R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M.,

- Mahasenan, K. V., Mobashery, S., Huang, P., Agarwal, G., & Fridman, R. (2013). Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry*, 288(11), 7430–7437.
104. Leitinger B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology*, 310, 39–87.
105. Carafoli, F., & Hohenester, E. (2013). Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochimica et biophysica acta*, 1834(10), 2187–2194.
106. Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309), 60–66.
107. Scheving, L. A., Stevenson, M. C., Taylormoore, J. M., Traxler, P., & Russell, W. E. (2002). Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(1), 197–203.
108. Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., & Guguen-Guillouzo, C. (1996). Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *The Journal of biological chemistry*, 271(19), 11484–11492.
109. Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M. L., & Starzl, T. E. (1986). Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. *Cancer research*, 46(3), 1318–1323.
110. Chang, T. T., & Hughes-Fulford, M. (2014). Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates. *Biomaterials*, 35(7), 2162–2171.
111. Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., & Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *The Biochemical journal*, 441(3), 763–787.
112. Sun, P., Zhang, G., Su, X., Jin, C., Yu, B., Yu, X., Lv, Z., Ma, H., Zhang, M., Wei, W., & Li, W. (2019). Maintenance of Primary Hepatocyte Functions In Vitro by Inhibiting Mechanical Tension-Induced YAP Activation. *Cell reports*, 29(10), 3212–3222.e4.
113. Xia, T., Zhao, R., Feng, F., Song, Y., Zhang, Y., Dong, L., Lv, Y., & Yang, L. (2018). Gene expression profiling of human hepatocytes grown on differing substrate stiffness. *Biotechnology letters*, 40(5), 809–818. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2536-1>
114. Walesky, C., Edwards, G., Borude, P., Gunewardena, S., O'Neil, M., Yoo, B., & Apte, U. (2013). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha deletion promotes diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rodents. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(6), 2480–2490.
115. Wu, X., Huang, K., Wei, C., Chen, F., & Pan, C. (2010). Regulation of cellular glutathione peroxidase by different forms and concentrations of selenium in primary cultured bovine hepatocytes. In *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(2), 153-161.
116. Kan, P., Miyoshi, H., & Ohshima, N. (2004). Perfusion of Medium with Supplemented Growth Factors Changes Metabolic Activities and Cell Morphology of Hepatocyte–Nonparenchymal Cell Coculture. In *Tissue Engineering*, 10(9-10), 1297-1307.
117. Nawa, K., Nakamura, T., Kumatori, A., Noda, C., & Ichihara, A. (1986). Glucocorticoid-

dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 261(36), 16883–16888.

118. LeCluyse, E. L., Bullock, P. L., & Parkinson, A. (1996). Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. In *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22(1-2), 133-186.

APÉNDICES

Apéndice 1. Factores de proliferación y crecimiento celular.

Factores de diferenciación y crecimiento celular	Nombre	Uso	Concentración	Sustrato de cultivo	Observación	Ref.
• Hormona	Insulina	Se usa como factor de crecimiento, ayuda a la supervivencia a largo plazo	• ITS: 1.0 g/L 100x -10 mg/L 1x- 0.1- µg/mL= 9.053x10 ⁻⁹ M	Hidrogeles PAA de 1 kPa	Permite la supervivencia hasta por 5 días	[41]
			• 40 nM= 0.442 µg/mL	Falcon flasks	Aumenta la proliferación en combinación con EGF (10 ng/mL). Aumenta la proliferación con EGF (10 ng/mL) + Glucagón (400 nM).	[64]
			• 10 ⁻⁸ M= 1.1047x10 ⁻⁴ µg/mL	Cajas Petri	Mantiene la secreción de albúmina al 50% del nivel inicial Aumentó la secreción de albúmina en combinación con DEX 10 ⁻⁷ Disminuyó la concentración de urea	[60]
	OSM	Es un regulador del crecimiento que inhibe la proliferación de varias líneas celulares tumorales. Regula la producción de citocinas, incluidas IL-6, G-CSF y GM-CSF de las células endoteliales	• 10 ng/mL	Placas de cultivo de tejidos recubiertas de gelatina al 0,1%.	En combinación con DEX (10 ⁻⁷ M) aumenta el almacenamiento de glucógeno (PAS) A esta concentración aumenta la secreción de albúmina.	[63]
• Cofactores	Selenio	Es un cofactor de la glutatión peroxidasa y otras proteínas, se utiliza como un antioxidante en el medio.	• ITS: 0.00067 g/L 100x - 0.67 µg/mL 1x - 6.7x10 ⁻³ µg/mL	Hidrogeles PAA	Sin resultado	[41]
			• 1.5 µmol/L	Cajas de poliestireno recubiertas con colágeno	Mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes en los hepatocitos y, por tanto, se redujo el estrés oxidativo	[115]
• Soluciones amortiguadoras	HEPES	Solución amortiguadora (valores de pKa 6.0-8.0) Mantiene el pH de 7.2 a 7.6 en cultivos celulares	• 10 mM	Hidrogeles PAA	Mantiene el pH estable	[41]
			• 15 mM WEM	Cajas Petri de vidrio	Mantiene el pH estable	[65]

• Factores de crecimiento	EGF	Actúa como un potente factor mitógeno que juega un papel importante en el crecimiento, proliferación celular	• 20 ng/mL HB-EGF + 10 ng/mL HGF	Cultivo de perfusión: Hepatocitos y las NPC se sembraron en una placa rectangular de vidrio recubierto de colágeno tipo I. Después la placa se ensambló en un placa de plástico para constituir una sección de flujo Placas de vidrio recubiertas con colágena (cultivo estático)	Mantuvieron la actividad metabólica del amoniaco 7 días en comparación con cultivos sin factores de crecimiento. La tasa de secreción de albúmina aumentó y se fue debilitando gradualmente durante 7 días.	[116]
			• 20 ng / mL	Hidrogeles PAA	Aumentó los agregados de hepatocitos, pero no su proliferación.	[41]
			• 10 ng/mL	Falcon flasks	Aumenta la proliferación, en combinación con insulina (40 nM) en comparación con un cultivo estándar.	[64]
	HGF	HGF juega un papel en la regulación positiva de la proliferación celular	• 20 ng/mL	Placas de cultivo de tejidos recubiertas de gelatina al 0,1%.	En combinación con DEX (10^{-7} M) aumenta el almacenamiento de glucógeno (PAS)	[63]
			• 10 ng/mL	Cajas de cultivo de poliestireno	Hubo un aumento significativo en la concentración de albúmina e indujo la proliferación de hepatocitos (24 h).	[59]
• Proteínas	Albúmina	La albúmina es un portador de esteroides, ácidos grasos y hormonas tiroideas y estabiliza el volumen de líquido extracelular.	1%	Cajas Petri	Protege a los ácidos grasos, a la cisteína, a el glutatión, a la bilirrubina y al piridoxal-5'-fosfato de la oxidación.	[60]
	Transferrina	Es un portador de hierro y también puede ayudar a reducir los niveles tóxicos de radicales de oxígeno y peróxido	• 0.55 g/L 100x- 550 mg/L 1x- 5.5 mg/L	Hidrogeles PAA	Evita la producción de radicales libres	[41]

• Fármacos	DEX	Promueve una arquitectura fenotípica cuboidal y facilita la expresión de factores de transcripción enriquecidos en hígado, como C / EBP α , HFN-4 α y RXR α . Las dosis altas de dexametasona pueden estimular la proliferación.	0.5 μ M /5x10 ⁻⁷ M	Suspensión de células	A las 2 h la transcripción del gen de la albúmina aumentó de forma dependiente de la dosis y a esta concentración se logró la estimulación máxima	[117]
			Se probaron (0.01, 0.1, 1, 5, 10 μ M)	Cajas Petri	inhibió la apoptosis de hepatocitos in vitro inducida por TNF-a y la lesión hepática in vivo al inhibir la activación de caspasa-8, -9 y -3 y la liberación de citocromo c mitocondrial. DEX también inhibió la apoptosis de hepatocitos inducida por anticuerpos anti-Fas al bloquear la formación de DISC y la activación de caspasa-8. Además, DEX aumentó el nivel de expresión de la proteína antiapoptótica cFLIPL-p43 in vitro e in vivo	[65]
			~50 nM (concentración baja)	Hepatocitos superpuestos con Matrigel®	Ayudan a prevenir el deterioro y desprendimiento de hepatocitos en cultivos a largo plazo (>1 semana)	
			> 1 μ M	Hepatocitos superpuestos con Matrigel	WEM: Mejora la morfología celular general, mejoran la formación de redes canaliculares e inhiben el crecimiento de tipos de células no parenquimatosas. También inducen la síntesis de ciertas enzimas metabolizadoras de fármacos, incluidos los miembros de los citocromos P450, UDP-glucuronosiltransferasas y glutatión S-transferasas	[118]

				Placas de cultivo de tejidos recubiertas de gelatina al 0,1%.	En esta concentración con HGF (20 ng/mL) o OSM (10 ng/mL) aumenta el almacenamiento de glucógeno. El pretratamiento previene apoptosis de los hepatocitos	[63]
			• 10 ⁻⁷ M	Cajas Petri	<p>Suprime ligeramente la hexoquinasa</p> <p>En combinación con insulina 10⁻⁸ y glucagón 10⁻¹⁰ aumentó el contenido de CYP450 al 65% en comparación con el control (sin hormonas)</p> <p>Mantiene la secreción de albúmina en el nivel inicial durante 13 días</p> <p>Aumento en la secreción de albúmina en combinación con insulina 10⁻⁸ independiente de la presencia de glucagón la cual por sí misma no tuvo efecto</p>	[60]

Apéndice 2. Oligonucleótidos para RT-PCR.

Nombre	Gen	FW. Oligonucleótido	REV. Oligonucleótido	Tm (°C)	Producto PCR (pb)		
		5'→3'	5'→3'		Ratón	Rata	Humano
Glucógeno sintasa	GYS2	CAGGTGCATTTTGAAGATGGCT	GCCATTCATGGAATTGGGCAA	60/59	247	247	247
Coenzima A del ácido biliar: aminoácido N-aciltransferasa	Baat	AGGTGGTATGTGGCACCTG	GACCTTAGGATGTCTCAGGAGAAA	59/57	285	285	285
			GACCTTGGATGTCTCAGGAGAAA				
Factor de coagulación XII	F7	GGCTGATGACCCAGGACT	TGGGAGACCCTGGTGTACAC	58/59	235	235	235
Acetil-CoA Acetiltransferasa 1	ACAT1	TGCAATTCAGGGAGCCATTGA	GGCCATCATGATGGCTTTCATTCC	59/60	199	199	199
Arginasa	ARG1	GTGGACCCTGGGGAACAC	CTGTGATGTAGAGACCTTCTCTG	59 / 57	-----	241	241
Glutamina sintetasa	GLUL	CTCAGCAAGTTCCCACTT	CATACAAGCAGGCCCGGTA	54 / 57	-----	548	548
Carboxilesterasa 1E	CES1E	GGGGATTCTTCAGCACAGGG	CCAAAGATGGTCACAGAGCCTG	60/60	133	133	133

* Cambio de base en la especie *Homo sapiens* en el gen Baat